



**Vers la modélisation physiopathologique de la
granulomatose septique chronique pour de nouvelles
approches thérapeutiques : développement de la culture
des cellules souches pluripotentes induites issues de
fibroblastes de patients**

Julie Brault

► **To cite this version:**

Julie Brault. Vers la modélisation physiopathologique de la granulomatose septique chronique pour de nouvelles approches thérapeutiques : développement de la culture des cellules souches pluripotentes induites issues de fibroblastes de patients. Sciences pharmaceutiques. 2013. dumas-00875988

HAL Id: dumas-00875988

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00875988>

Submitted on 23 Oct 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2013

N° :

**VERS LA MODELISATION PHYSIOPATHOLOGIQUE DE LA GRANULOMATOSE
SEPTIQUE CHRONIQUE POUR DE NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES**

**Développement de la culture des cellules souches pluripotentes induites issues de
fibroblastes de patients**

MEMOIRE DU DIPLOME D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Conformément aux dispositions du décret n° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

Présenté à la Faculté de Pharmacie de GRENOBLE

Et soutenu publiquement le : 02 Octobre 2013

Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Par :

Julie BRAULT

Née le 23 Décembre 1986 à Brest

JURY

Président du Jury : Monsieur le Professeur Michel SEVE

Membres : Monsieur le Docteur Jean-Paul BRION

Monsieur le Docteur Walid RACHIDI

Madame le Docteur Marie-Jeanne RICHARD

Madame le Docteur Marie José STASIA

Madame le Docteur Marie-Thérèse ZABOT

Doyen de la Faculté : M. Christophe RIBUOT

Vice-doyen et Directeur des Etudes : Mme Delphine ALDEBERT

Année 2012-2013

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=11)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I.)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I.) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEUR EMERITE (n=1)

GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)
---------	-------	--

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=31)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)

CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=3)

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I/MCU-PH)

PROFESSEUR CERTIFIE (PRCE) (n=2)

FITE	Andrée	P.R.C.E
GOUBIER	Laurence	P.R.C.E

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=4)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)
DON	Martin	Laboratoire TIMC-IMAG

PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG) (n=1)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
----------	---------------	---------

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

SUEUR	Charlotte	Virologie (U.V.H.C.I)
VAN NOOLEN	Laetitia	Biochimie Toxicologie (HP2-DBTP-BGM)

ATER (n= 6)

DAYDE David	ATER	Parasitologie Mycologie (J.R)
FAVIER Mathieu	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
HADDAD-AMAMOU Anis	ATER	Laboratoire de Pharmacie Galénique
HENRI Marion	ATER	Physiologie – Laboratoire HP2 (JR)
LEHMANN Sylvia	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)
REGENT-KLOEKNER Myriam	ATER	Biochimie (LECA-UJF)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=9)

CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
MELAINE	Feriel	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
LECERF-SHMIDT	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Pharmacochimie (DPM)
BERTHOIN	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
MORAND	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire HP2 (JR)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Au Président de Thèse

Monsieur le Professeur Michel SEVE

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites d'assurer la présidence de mon jury de Thèse.

Veillez recevoir l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A la Directrice de Thèse et membre du jury

Madame le Docteur Marie José STASIA

Je vous remercie de m'avoir permis de travailler sur le sujet dont je rêvais.

Depuis deux ans, votre disponibilité, votre optimisme et vos encouragements ainsi que vos conseils

m'ont permis de progresser en tant que chercheuse... Et c'est avec sérénité et beaucoup d'enthousiasme que j'aborde cette troisième année de Thèse de Sciences sous votre direction.

Aux membres du jury

Monsieur le Docteur Jean-Paul BRION

Vous me faites l'honneur de participer à la critique de ce travail.

Soyez assuré de ma profonde considération.

Monsieur le Docteur Walid RACHIDI

Vous avez accepté de juger ce travail et je vous en remercie très sincèrement.

Merci également pour votre gentillesse et votre aide dans ce projet.

Madame le Docteur Marie-Jeanne RICHARD

Vous m'avez orientée au moment où je devais faire mes seconds pas de chercheuse.

Je vous remercie également d'avoir accepté d'être membre de mon jury de Thèse.

Madame le Docteur Marie-Thérèse ZABOT

Mes premiers pas en tant qu'Interne en Pharmacie se sont fait dans votre service, le Centre de Biotechnologie Cellulaire à Lyon, mais également mes premiers pas, sûrement un peu hésitants, en tant que chercheuse. Je suis heureuse que vous ayez accepté de faire partie de mon jury.

A ceux qui ont collaboré de près ou de loin à ce travail

Je remercie le Professeur Benoît Polack de m'accueillir à l'Institut de Biologie et Pathologie du CHU de Grenoble, mais également au sein de l'équipe de recherche TheREx du laboratoire TIMC/Imag.

Je remercie le Professeur Bertrand Toussaint de son aide et du soutien qu'il m'a apporté pour le déroulement de ma carrière.

Je souhaite remercier le Professeur Karl-Heinz Krause de m'avoir accueillie dans son laboratoire à Genève et pour ses conseils toujours judicieux. Merci à toute son équipe, notamment Diderik, Maxime, Mitra, Vannary pour leurs trucs et astuces afin d'approvoiser la culture des cellules iPS et pour leur disponibilité pour répondre à mes nombreuses questions.

Je remercie également le Docteur Tomo Saric et son équipe sans qui nos petites cellules iPS n'auraient pu voir le jour.

Un grand merci au Docteur Michel Diserbo pour son temps et l'irradiation des cellules nourricières.

Je remercie le Docteur Didier Grunwald pour sa collaboration pour les expériences de microscopie confocale.

Je remercie le Docteur Florence Amblard de m'avoir permis d'effectuer le caryotype au sein de l'unité de Génétique Chromosomique. Je tiens à remercier les Docteurs Véronique Satre et Françoise Devillard pour leurs conseils et leurs encouragements. C'est également grâce à l'aide du Docteur Franck Pellestor que nous avons pu mettre en place la technique de caryotype. Un grand merci à Colette Boisgontier et Jérôme Dijon pour leur investissement et leur motivation dans ce projet.

Impossible d'écrire des remerciements sans parler de l'équipe CGD : Michèle, Cécile, Lila, Sylvain, Charlotte, Pascal et notre Cégédine. Grâce à votre gentillesse, je me suis tout de suite sentie accueillie. Une petite dédicace spéciale à Erwan pour m'avoir secondé avec efficacité. Vous m'avez accompagnée et aidée tout au long de ce projet par vos conseils, vos heures de *babby-sitting* de mes précieuses cellules ou tout simplement votre présence. Vous me dites toujours que je parle trop... et bien là, que diriez-vous ???

Un immense merci aux membres du BEP, biologistes et techniciens, pour leur bonne humeur, les petits dèj', les discussions en salle de culture... et mon chapeau !

Je remercie également l'ensemble des membres de l'équipe TheREx que je côtoie depuis maintenant deux ans : Marie-Claire, Xavier, Audrey, Roberta, Julie, Landry et tous ceux que je ne cite pas... Merci notamment à Lionel et David de faire partie de la « Team iPS », je me sens moins seule...

A ma famille

A mes parents et mon frère qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans tous mes projets...

A ma « grande sœur » Flora, Bruno, mes nièces et mon filleul pour les week-end de « détente » qui me font toujours plaisir.

A mes amis

Aux amies de toujours, Vaness, Laure, Laeti, Mélanie, Cécile et Emilie. Je ne serai pas la personne que je suis aujourd'hui sans vous...

A ceux avec qui j'ai partagé mes plus belles années de fac, des soirées inoubliables, des voyages. A Pasc, Anaïs, Pat, Mathilde, Virg, Cyril, Nico, Johnny, Laurence, Cédric, Anne-Cé, Marianne, Flo, Sarah...

A ceux que j'ai rencontré pendant mon Internat. A Kathy, Minh, Maud, Antho, Pauline, Manu, Delphine, Sara, Anne-C, Camille, Mélanie, Anne, Marie, Nuria... Que de bons moments passés ensembles et bien d'autres à venir...

A Pierre

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION	9
Chapitre 1 : La Granulomatose Septique Chronique.....	10
1. Généralités.....	10
2. Rappels sur le complexe NADPH oxydase	10
2.1. Structure du complexe NADPH oxydase	11
2.1.1. Le cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ membranaire	12
2.1.2. Les facteurs cytosoliques	13
2.1.3. La petite protéine G monomérique : Rac1/2.....	14
2.2. Activation de la NADPH oxydase et production de dérivés toxiques de l'oxygène	14
2.2.1. Activation et assemblage du complexe NADPH oxydase	14
2.2.2. Autres fonctions de la NADPH oxydase	15
3. Génétique de la CGD	16
3.1. Transmission liée à l'X	16
3.2. Transmission autosomique récessive (AR)	17
4. Physiopathologie de la CGD	18
5. Diagnostic	20
5.1. Diagnostic clinique.....	20
5.2. Diagnostic fonctionnel classique	20
5.3. Diagnostic biochimique	21
5.4. Diagnostic génétique	21
6. Les modèles d'étude de la CGD	22

6.1. Les modèles cellulaires	22
6.1.1. Les lymphocytes B immortalisés par le virus d'Epstein-Barr (LB-EBV)	22
6.1.2. La lignée promyélocytaire PLB-985.....	22
6.1.3. Les cellules K562	23
6.1.4. Les autres modèles cellulaires non phagocytaires	23
6.2. Les modèles animaux	24
6.2.1. Modèle CGDX.....	24
6.2.2. Modèle CGDAR47	24
6.2.3. Modèle CGDAR22	25
7. Prévention et traitements	25
7.1. Prise en charge des patients CGD.....	25
7.2. Chimio prophylaxie.....	26
7.3. Traitement des épisodes infectieux aigus	28
7.4. La transplantation de moelle osseuse/cellules souches hématopoïétiques.....	31
7.5. La thérapie génique.....	33
 Chapitre 2 : Les cellules souches pluripotentes induites	39
1. Généralités sur les cellules souches chez l'Homme	39
1.1. Les différents types de cellules souches humaines.....	39
1.2. La reprogrammation nucléaire en cellules souches pluripotentes	42
2. La "création" des cellules iPS.....	44
2.1. Historique des cellules iPS.....	44
2.2. Le processus de reprogrammation.....	46
2.2.1. Les facteurs de transcription Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog et Lin28.....	46
2.2.2. Le processus séquentiel de la reprogrammation	47
3. Vers l'amélioration des protocoles de reprogrammation.....	48

3.1. Choix de la cellule source	49
3.2. Le cocktail de reprogrammation	51
3.2.1. Les facteurs de transcription	51
3.2.2. Les petites molécules.....	52
3.3. Les vecteurs utilisés.....	53
3.3.1. Les méthodes virales.....	55
3.3.2. Les méthodes non virales	57
3.4. Les autres paramètres influençant la reprogrammation	60
4. Les techniques de culture des cellules souches pluripotentes	60
4.1.1. Milieux et supports de culture.....	61
4.1.2. L'atmosphère	65
5. Caractérisation des cellules iPS	66
5.1. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules iPS	66
5.2. Variations génétiques et épigénétiques.....	67
6. Vers des applications porteuses d'espoir.....	71
6.1. Applications <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	72
6.1.1. Modélisation cellulaire, thérapie cellulaire et toxicologie	72
6.2. Modélisation physiopathologique, développement de nouveaux médicaments et thérapie génique.....	74
6.3. Modélisation physiopathologique de la CGD grâce à l'utilisation des cellules iPS	75
6.3.1. Les modèles de neutrophiles CGDX.....	75
6.3.2. Les modèles de macrophages CGDX et CGDAR47	76
MATERIEL ET METHODES	79
1. Culture cellulaire.....	79
1.1. Culture des fibroblastes CGDX.....	79

1.2. Culture des fibroblastes embryonnaires murins MEFs	80
1.3. Reprogrammation des fibroblastes en cellules iPS	81
1.4. Culture des cellules iPS	82
1.4.1. Préparation des plaques de culture	82
1.4.2. Culture des cellules iPS	82
2. Les corps embryoïdes (EBs)	84
3. Cytométrie en flux : analyse de la pluripotence.....	85
4. Immunocytochimie.....	87
4.1. Pluripotence des colonies de cellules iPS	87
4.2. Marqueurs des 3 lignées embryonnaires des EBs	88
5. Méthodes de biologie moléculaire.....	89
5.1. Extraction de l'ADN génomique	89
5.2. Amplification de l'exon 5 de <i>CYBB</i> par PCR	90
5.3. Migration sur gel d'agarose.....	91
5.4. Séquençage.....	91
6. Caryotype.....	91
RESULTATS	94
1. Reprogrammation des fibroblastes en cellules iPS	94
2. Mise en place de la culture des cellules iPS	94
3. Vérifier la pluripotence des cellules iPS	97
3.1. Expression des facteurs de transcription et marqueurs de pluripotence	97
3.1.1. Analyse par immunofluorescence	98
3.1.2. Analyse par cytométrie en flux	99
3.2. Les corps embryoïdes	100

3.2.1. Choix de la technique de formation des corps embryoïdes	100
3.2.2. Les 3 lignées embryonnaires.....	101
4. Stabilité chromosomique des lignées iPS.....	103
5. Modélisation de la mutation génétique.....	104
DISCUSSION / PERSPECTIVES.....	106
CONCLUSION	115
BIBLIOGRAPHIE.....	116
ANNEXE.....	143

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : La formation du phagosome et la production de dérivés oxydatifs pour la destruction des microorganismes pathogènes par les phagocytes	11
Figure 2. Le complexe NADPH oxydase au repos et après activation	12
Figure 3. Production de dérivés toxiques de l'oxygène par la NADPH oxydase.....	15
Figure 4. Le principe de la thérapie génique chez l'Homme.....	33
Figure 5. Les différents types de cellules souches humaines, leurs origines et leur capacité de différenciation.....	39
Figure 6. Modes de division et potence des cellules souches.....	40
Figure 7. Le mécanisme de transfert nucléaire de cellules somatiques (TNCS).....	43
Figure 8. Principe de la fusion cellulaire de cellules somatiques avec des cellules pluripotentes conduisant à la génération soit d'une cellule hybride, soit d'un hétérocaryon.	44
Figure 9. Evolution des méthodes de génération des cellules iPS murines.....	45
Figure 10. Le réseau de la pluripotence dans les cellules ES.....	46
Figure 11. Le « labyrinthe » de la pluripotence lors de la reprogrammation en cellules iPS.....	47
Figure 12. Vue d'ensemble du processus de reprogrammation et des différents paramètres à déterminer pour l'obtention d'une lignée de cellules iPS.....	49
Figure 13. Influence du type cellulaire de départ sur la reprogrammabilité en cellules iPS, en fonction de sa disponibilité/accessibilité.....	50
Figure 14. Les stratégies de reprogrammation des cellules somatiques en cellules iPS par différentes méthodes de délivrance des facteurs de reprogrammation.....	54
Figure 15. L'évolution des conditions de culture des cellules souches pluripotentes humaines (hPSCs).....	61
Figure 16. Variations génétiques et épigénétiques, leurs causes, leurs conséquences fonctionnelles et leurs impacts sur les applications.....	68
Figure 17. Les applications des cellules iPS..	72
Figure 18. Protocole de différenciation des fibroblastes témoin et CGDX en cellules iPS par transduction rétrovirale à l'aide d'un vecteur OSKM.....	81
Figure 19. Marquage de l'activité phosphatase alcaline des colonies iPS pour les 4 clones..	94
Figure 20. Culture des cellules iPS sur cellules nourricières MEFs inactivées par la mitomycine C ou irradiation γ , et sur matrice extracellulaire Matrigel TM ou Vitronectine XF TM	95
Figure 21. Agrandissement d'une colonie de cellules iPS cultivées sur Matrigel TM	96
Figure 22. Expression de Tra-1-85 par les cellules iPS en culture sur des MEFs.	97

Figure 23. Expression des marqueurs de pluripotence par immunofluorescence sur des colonies iPS NP26 clone 3 (passage 23) en culture sur des MEFs	98
Figure 24. Analyse par cytométrie en flux de l'expression des facteurs de transcription (Oct3/4, Sox2, Nanog) et des marqueurs de pluripotence (SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-81) par la lignée iPS NP26 clone 3 au passage 22	99
Figure 25. Comparaison de l'expression des marqueurs de pluripotence par les 4 clones de cellules iPS.	99
Figure 26. Immunofluorescence montrant la différenciation <i>in vitro</i> des corps embryoïdes vers les types cellulaires issus des 3 lignées embryonnaires.	102
Figure 27. Métaphases obtenues à partir de la procédure de préparation des chromosomes sur cellules issues du sang.....	103
Figure 28. Caryotype réalisé sur la lignée NP26 clone 4 au passage 26.....	104
Figure 29. Contrôle de l'amplification de l'exon 5 de <i>CYBB</i> sur les 4 clones de cellules iPS sur gel d'agarose 0,8 %.	105
Figure 30. Séquençage de l'exon 5 de <i>CYBB</i> chez les lignées iPS NP26 et NP21.....	105

Tableaux

Tableau 1. Les formes génétiques de la CGD, les gènes impliqués et leurs fréquences.....	16
Tableau 2. Tableau récapitulatif des principales méthodes de reprogrammation.....	55
Tableau 3. Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux et leurs conditions d'utilisation.....	86
Tableau 4. Liste des anticorps utilisés pour l'immunofluorescence et leur dilution.....	88
Tableau 5. Mélange à réaliser pour l'amplification de l'exon 5 de <i>CYBB</i> par PCR	90
Tableau 6. Séquence des amorces de l'exon 5 de <i>CYBB</i>	91
Tableau 7. Les différentes méthodes de formation des corps embryoïdes, leurs avantages et inconvénients	101

TABLE DES ABREVIATIONS

2-βME	2-β mercaptoethanol
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
CGD	Chronic Granulomatous Disease
CMV	Cytomegalovirus
CSE	Cellule Souche Embryonnaire
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
DHR	Dihydrorhodamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EBs	Embryoid bodies
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
fMLP	N-formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine
hbFGF	human basic Fibroblast Growth Factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
iPSC	induced Pluripotent Stem Cells
LTR	Long Terminal Repeat
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
NBT	Nitrobleu de tétrazolium
OSKMNL	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28
PM	Poids moléculaire
PMA	Phorbol Myristate Acétate
ROS	Reactive Oxygen Species
SIN	Self Inactivating Vector
SSEA	Stage Specific Embryonic Antigen
SVF	Sérum de Veau Foetal
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
Tzv	Thiazovivine
VPA	Acide valproïque
ZFN	Zinc Finger Nuclease

**INTRODUCTION
ET
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

INTRODUCTION

Le travail présenté ici s'inscrit dans un vaste projet initié par le Pr KRAUSE (Université de Genève, Suisse), le Dr STASIA (Université de Grenoble, France) et le Dr SARIC (Université de Cologne, Allemagne). Il s'agit de générer des modèles physiopathologiques cellulaires et animaux de la Granulomatose Septique Chronique (CGD) à partir des cellules souches pluripotentes induites (iPS), et cela dans le but de développer une approche thérapeutique innovante basée sur la thérapie protéique.

La Granulomatose Septique Chronique (CGD) sera présentée dans la première partie de l'Introduction, avec l'accent mis notamment sur les traitements disponibles ou en développement.

Puis, des rappels sur les cellules souches pluripotentes et sur les premières techniques de reprogrammation nucléaire permettront de comprendre comment toutes ces recherches ont abouti à la création des cellules souches pluripotentes induites (iPS). Les techniques de reprogrammation, les méthodes de culture ainsi que les caractéristiques de ces cellules iPS seront plus particulièrement développées.

La première partie de ce projet, qui fait l'objet de ce travail de Thèse de Pharmacie, a consisté à implanter et développer la culture des cellules iPS au laboratoire. Les résultats correspondant à leur mise en place et à leur caractérisation seront présentés.

Chapitre 1 : La Granulomatose Septique Chronique

1. Généralités

La Granulomatose septique chronique (CGD) est une immunodéficience héréditaire orpheline touchant l'immunité innée. Sa fréquence est estimée entre 1/200 000 et 1/250 000 naissances/an (1) mais peut varier selon les pays et les pratiques ethniques (intermariages) (2).

C'est en 1954 que les premiers cas de CGD ont été rapportés chez des jeunes garçons souffrant d'infections récurrentes (3). Cette pathologie a été pour la première fois étudiée par Berendes, Bridges et Good en 1957 et décrite comme une maladie granulomateuse fatale de l'enfance avant 10 ans (4). Elle était définie alors comme un syndrome clinique distinct composé d'une combinaison d'infections récurrentes suppuratives graves, avec formation de granulomes (donnant son nom à cette pathologie) et autres complications inflammatoires (5). Quelques années plus tard, il a été montré qu'il s'agissait d'une maladie des cellules phagocytaires impliquées dans la réponse immunitaire non spécifique de l'hôte (6,7), et causée par le dysfonctionnement d'une seule enzyme : la NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) oxydase (8,9). Ces premiers cas cliniques rapportaient seulement des formes liées à l'X touchant les garçons mais progressivement la transmission autosomique récessive a été soupçonnée puisque des cas féminins ont été décrits (10,11).

2. Rappels sur le complexe NADPH oxydase

Lors d'une infection, les cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, monocytes et macrophages) constituent la première ligne de défense de l'hôte contre les microorganismes, et représentent les principaux acteurs de la réponse immunitaire innée non spécifique. Ce mécanisme de défense fait intervenir différents processus tels que l'adhérence, le chimiotactisme, la phagocytose des pathogènes, la dégranulation des enzymes des granules et vésicules cytoplasmiques (permettant la digestion du microorganisme) ainsi que l'activation de la NADPH oxydase membranaire, responsable de la microbicidie. Divers stimuli produits directement au niveau du site infectieux et inflammatoire (des peptides chimioattractants comme le fMLP (N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine), le composant C5a du complément, l'interleukine 8, le PAF (*platelet activating factor*), les leucotriènes,...) vont attirer les phagocytes au site inflammatoire et infectieux et pré-activer la NADPH oxydase. Ce n'est que le contact spécifique des opsonines et autres composants de la membrane bactérienne ou fongique avec des récepteurs membranaires du

phagocyte, qui déclenche réellement l'activation de la NADPH oxydase et entraîne la production d'ions superoxyde et de dérivés toxiques de l'oxygène (ROS ou FRO) microbicides (Figure 1).

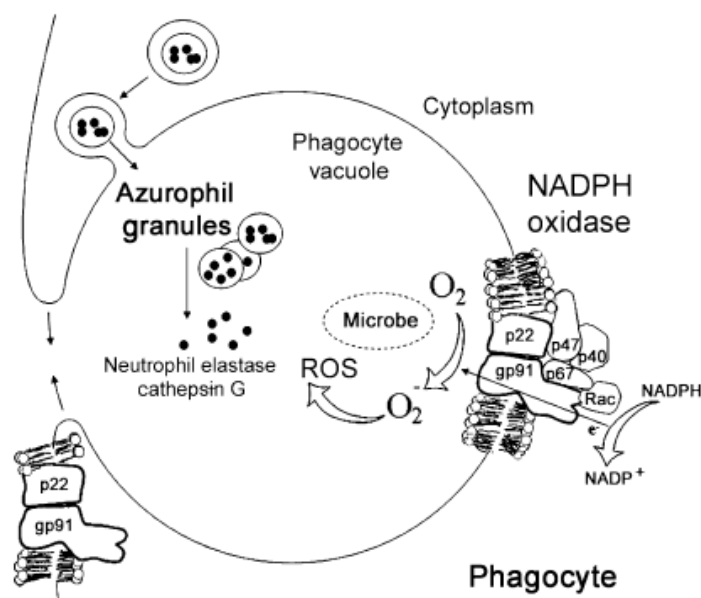


Figure 1 : La formation du phagosome et la production de dérivés oxydatifs pour la destruction des microorganismes pathogènes par les phagocytes. D'après (12) Seger, *British Journal of Haematology* (2008).

2.1. Structure du complexe NADPH oxydase

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique composé d'un élément protéique membranaire, le cytochrome b_{558} , formé des deux sous-unités gp91^{phox} ou NOX2 et p22^{phox} (13), et de facteurs cytosoliques p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox} (*phox* = *phagocytic oxydase*). Deux petites protéines G Rac et Rap1 participent à la régulation de son activité (14). Au repos ce complexe est dissocié (Figure 2A).

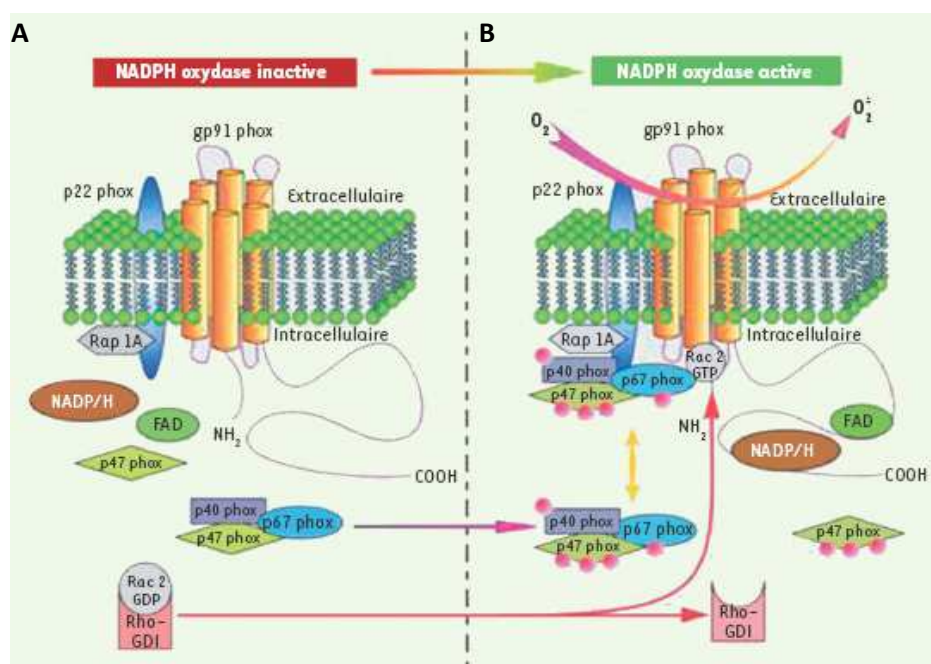


Figure 2. Le complexe NADPH oxydase au repos (A) et après activation (B). Les points roses représentent les sites de phosphorylation des différentes sous-unités lors de l'activation de la NADPH oxydase. Figure modifiée d'après (15) Guichard *et al.*, *Medicine/Sciences* (2006).

2.1.1. Le cytochrome b_{558} membranaire

Le cytochrome b_{558} est l'élément rédox du complexe NADPH oxydase. Dans les neutrophiles non stimulés, 90-95 % du cytochrome b se trouve au niveau des membranes des granules spécifiques (environ 100 pmol/mg de protéine) (16) ou de granules contenant de la gélatinase, les 15 % restant étant localisés au niveau de la membrane plasmique et des granules sécrétoires (17). Le cytochrome b_{558} est tout d'abord synthétisé sous forme d'un précurseur non glycosylé de 58 kDa environ, puis, après glycosylation progressive, il conduit à un composé de 76-90 kDa. La synthèse des deux sous-unités du cytochrome b_{558} est donc nécessaire pour leur stabilisation mutuelle au niveau de la membrane : l'absence de l'une des deux conduit à l'absence du cytochrome b_{558} (18).

▪ La sous-unité $gp91^{phox}$ (NOX2)

Cette sous-unité constitue la sous-unité β du cytochrome b_{558} . C'est une protéine fortement glycosylée de 570 acides aminés (PM : 65,3 kDa) composée de 6 hélices transmembranaires situées du côté amino-terminal comportant 2 sites extracellulaires de glycosylation (boucles C et E), de 2 boucles B et D intra-cytoplasmiques, et d'une queue cytosolique carboxy-terminale hydrophile contenant les sites potentiels de fixation du FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et du NADPH (19). Les deux hèmes, liés à 4 histidines situées dans le 3^{ème} (résidus 101 et 115) et le 5^{ème} passage transmembranaire (résidus 209 et 222) (20), sont essentiels au passage électronique du FAD vers l' O_2 .

extracellulaire. Cette sous-unité gp91^{phox} constitue ainsi l'élément rédox de l'enzyme. Il existe 7 isoenzymes NOX/DUOX chez l'Homme (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2) exprimés dans de nombreux types cellulaires et tissus, et possédant des mécanismes d'activation variés ainsi que des rôles biologiques physiologiques spécifiques. L'H₂O₂ produit servirait notamment de second messenger pour la signalisation intracellulaire. Ces enzymes NOX/DUOX sont, entre autres, impliquées dans des mécanismes d'oncogénèse, des maladies du système nerveux central et du système cardiovasculaire (21,22).

▪ La sous-unité p22^{phox}

Sous-unité α du cytochrome *b*₅₅₈, cette protéine de 195 acides aminés (PM : 22 kDa) est non glycosylée. Comme NOX2, sa structure n'est à ce jour pas complètement élucidée. Elle serait formée d'une région N-terminale avec des régions hydrophobes permettant son ancrage dans la membrane plasmique mais le nombre de passage transmembranaires (2 à 4) reste inconnu, bien que l'hypothèse de 3 domaines transmembranaires soit actuellement favorisée (23). Son domaine cytoplasmique C-terminal contient une région riche en résidus proline interagissant avec les sous-unités p47^{phox} (24). Son expression n'est pas exclusivement restreinte aux cellules phagocytaires puisqu'on la retrouve dans de nombreux tissus associée à d'autres NOX (25).

2.1.2. Les facteurs cytosoliques

La sous-unité p47^{phox} est une protéine très basique de 390 acides aminés (PM : 44,7 kDa) (26) qui possède un domaine C-terminal riche en résidus arginine et sérine avec 11 sites potentiels de phosphorylation (17,23). Sous-unité organisatrice, elle permet la migration du complexe cytoplasmique p47^{phox}-p40^{phox}-p67^{phox} jusqu'au cytochrome *b*₅₅₈ après activation de la NADPH oxydase (27).

La sous-unité p67^{phox} est une protéine de 526 acides aminés (PM : 59,8 kDa), légèrement acide (17). Elle contient un domaine interagissant avec Rac au niveau de la partie N-terminale, et également des domaines d'interaction avec p40^{phox}, p47^{phox} et le cytochrome *b*₅₅₈ (27,28). Elle est considérée comme « l'activateur » du complexe NADPH oxydase (29).

Dernière sous-unité identifiée (30), p40^{phox} est une protéine de 339 acides aminés (PM : 39 kDa) interagissant faiblement avec p47^{phox} et p67^{phox}, et dont la fonction régulatrice, activatrice (31,32) ou inhibitrice (33,34), est toujours controversée (35). L'absence de p40^{phox} empêche l'activation de la NADPH oxydase après phagocytose (36).

2.1.3. La petite protéine G monomérique : Rac1/2

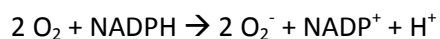
Appartenant à la sous-famille Rho au sein de la superfamille Ras des petites protéines (environ 21 kDa) liant le GTP sous sa forme active, Rac est nécessaire à la fonction de l'oxydase et se lie exclusivement à $p67^{phox}$. Rac1 est exprimé de façon ubiquitaire alors que Rac2 est uniquement exprimé dans les cellules myéloïdes (37). Le cytosol des neutrophiles contient ainsi principalement Rac2 (> 96 %). L'activation du complexe NADPH oxydase nécessite sa dissociation de rhoGDI au niveau du cytosol (GDP Dissociation Inhibitor) et sa liaison au GTP (Figure 2) (38).

2.2. Activation de la NADPH oxydase et production de dérivés toxiques de l'oxygène

2.2.1. Activation et assemblage du complexe NADPH oxydase

Dans les cellules au repos, le complexe NADPH oxydase est dissocié et inactif, et les protéines $p67^{phox}$, $p47^{phox}$ et $p40^{phox}$ forment un complexe dans le cytosol (Figure 2A). Lors de la reconnaissance spécifique d'un élément pathogène/stimulateur par la cellule phagocytaire, il y a déclenchement d'une cascade de signalisation intracellulaire conduisant à la phosphorylation des facteurs cytosoliques et à leur migration vers la membrane plasmique ou la membrane de la vacuole de phagocytose (phagolysosome) (Figure 2B). Ils vont alors s'associer au cytochrome b_{558} membranaire, lequel a également subi des changements conformationnels (17). L'activation de la cellule phagocytaire nécessite également l'implication des petites protéines G, Rac1/2 et Rap1, ainsi que des protéines liant le calcium (MRP8 et MRP14), intervenant dans la régulation de l'activité du complexe oxydase (39).

Après assemblage du complexe NADPH oxydase permettant son activation, le NADPH cytoplasmique est oxydé en $NADP^+$ au niveau de la queue cytosolique de $gp91^{phox}$ avec transfert de deux électrons vers le FAD puis vers les hèmes (Figure 3). La dernière étape de ce transport d'électrons a lieu dans les vacuoles ou en extracellulaire lorsque l' O_2 accepte l'électron et est converti en anion superoxyde O_2^- selon la réaction suivante :



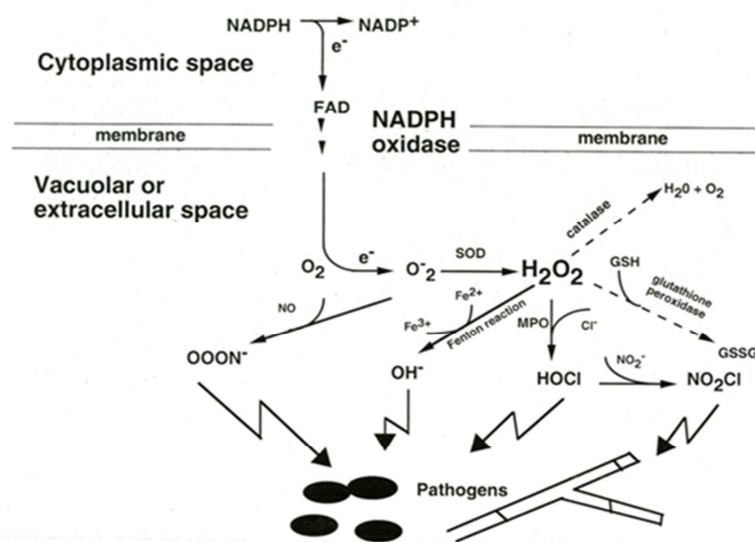


Figure 3. Production de dérivés toxiques de l'oxygène par la NADPH oxydase. D'après (17) Segal *et al.*, *Medicine* (2000).

La consommation intense d'oxygène associée à cette activation, appelée « burst oxydatif » ou « explosion respiratoire », va conduire à la génération d'une quantité importante de cet anion superoxyde (100 fois plus qu'au repos), un oxydant avec une activité microbicide modérée en équilibre constant avec le radical perhydroxyle HO_2^\cdot beaucoup plus oxydant. Cet anion superoxyde constitue également le point de départ de la synthèse des formes réactives de l'oxygène FRO (ou ROS, *reactive oxygen species*) hautement toxiques pour le pathogène, faisant intervenir différentes enzymes. Ainsi, il peut être transformé, soit spontanément soit par la superoxyde dismutase (SOD), en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui, à son tour, peut être transformé par la myéloperoxydase (MPO) présente dans les granules azurophiles en acide hypochloreux HOCl très toxique. H_2O_2 peut également réagir avec l'anion superoxyde pour former un radical hydroxyle OH^\cdot hautement réactif. Il peut cependant interagir avec des amines primaires ou secondaires et former des N-chloramines plus stables. D'autres métabolites peuvent être produits tels que l'anion peroxynitrite ONOO^- , ou le nitryl chloride NO_2Cl et le NO_2^- qui sont des oxydants pro-inflammatoires. Pour réguler ce système et éviter l'accumulation de dérivés toxiques de l'oxygène dans la cellule comme le peroxyde d'hydrogène, il y a intervention d'enzymes de détoxification comme la catalase qui le réduit en O_2 et en H_2O , et comme la glutathion peroxydase (GSH) (17).

2.2.2. Autres fonctions de la NADPH oxydase

Les ROS générés par la NADPH oxydase activée induiraient la libération des NET (*neutrophil extracellular traps*) par les neutrophiles. Ces NETs, formés de chromatine et de protéines des

granules, vont se lier aux agents pathogènes et, grâce à une forte concentration locale en molécules anti-microbiennes, permettre ainsi leur destruction (40). Les patients atteints de CGD seront donc incapables de générer des NETs (41).

3. Génétique de la CGD

La granulomatose septique chronique peut être causée par des mutations dans l'un des 5 gènes codant pour les différentes sous-unités du complexe NADPH oxydase (Tableau 1).

La localisation des mutations est très variable : région promotrice de gène, jonction intron/exon, exons ; ainsi que le type de mutations retrouvées : délétions et/ou insertions de taille variable avec décalage du cadre de lecture, mutations ponctuelles non-sens, faux-sens, inversions... La majorité de ces mutations résultent en l'absence de la protéine par défaut de synthèse de l'ARNm ou par instabilité de la protéine mutée (tronquée ou malformée).

Tableau 1. Les formes génétiques de la CGD, les gènes impliqués et leurs fréquences.

Sous-unité	Gènes	Localisation chromosomique	Mode de transmission	Sous-type	Dénomination	Fréquence
gp91^{phox} (Nox2)	<i>CYBB</i> Taille : 30 kb Nb d'exons : 13	Xp21.1	Liée à l'X	X91 ⁰ X91 ⁻ X91 ⁺	CGDX91 ⁰ CGDX91 ⁻ CGDX91 ⁺	65 %
p22^{phox}	<i>CYBA</i> Taille : 8,5 kb Nb d'exons : 6	16q24	Récessive autosomale	A22 ⁰ A22 ⁺	CGDAR22 ⁰ CGDAR22 ⁺	< 5 %
p47^{phox}	<i>NCF1</i> Taille : 15,2 kb Nb d'exons : 11	7q11.23	Récessive autosomale	A47 ⁰	CGDAR47 ⁰	25 %
p67^{phox}	<i>NCF2</i> Taille : 37 kb Nb d'exons : 16	1q25	Récessive autosomale	A67 ⁰ A67 ⁻	CGDAR67 ⁰ CGDAR67 ⁻	< 5 %
p40^{phox}	<i>NCF4</i> Taille : 18 kb Nb d'exons : 10	22q13	Récessive autosomale	A40 ⁰	CGDAR40 ⁰	1 cas

3.1. Transmission liée à l'X

La forme CGDX est la plus fréquente (environ 65 % des cas) et est due à des mutations affectant le gène *CYBB* localisé sur le bras court du chromosome X (Xp21.1), composé de 13 exons, et codant pour la sous-unité gp91^{phox} (42). Plus de 680 mutations différentes ont été identifiées (43). Comme toutes les pathologies touchant le chromosome X, seuls les garçons sont atteints, les femmes étant possiblement « porteuses » et responsables de la transmission. Des mutations *de novo* apparaissent dans environ 10 % des cas (17,44).

Il existe des formes variantes selon le taux de la protéine NOX2 mutée exprimée :

- **CGDX⁰** : forme la plus classiquement retrouvée, les deux sous-unités gp91^{phox} et p22^{phox} du cytochrome b₅₅₈ sont absentes bien que seul le gène *CYBB* soit atteint.
- **CGDX⁺** : présence d'une protéine gp91^{phox} mutée inactive et produite en quantité normale. Les mutations, principalement localisées dans la partie C-terminale, suggèrent que cette séquence est particulièrement impliquée dans le fonctionnement de l'oxydase et peu dans la stabilisation de sa structure protéique (45,46).
- **CGDX⁻** : la protéine gp91^{phox} mutée est sous-exprimée et résulte d'une mutation généralement faux-sens à l'origine d'une perte de la conformation stable de gp91^{phox} ou, plus rarement, de mutations dans le promoteur du gène *CYBB* (47).

3.2. Transmission autosomique récessive (AR)

Il existe quatre formes selon le gène affecté : *NCF1*, *NCF2*, *NCF4* (*NCF* = *neutrophil cytosolic factor*) ou *CYBA* codant respectivement p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} et p22^{phox} (48). Plus rares, et représentant à peine un tiers de tous les cas de CGD (Tableau 1), elles touchent des patients des deux sexes et nécessitent une mutation bi-allélique transmise par chacun des deux parents. C'est pourquoi une consanguinité parentale est souvent observée dans les formes AR (49).

Les mutations touchant *NCF1*, gène situé sur le bras long du chromosome 7 (7q11.23) et composé de 9 exons (50), sont responsables de la majorité des CGD autosomales récessives (CDGAR) (environ 20-25 %). Une délétion GT (Δ GT) au début de l'exon 2 est responsable de 95 % des CGDAR47⁰. Elle est causée par des événements recombinaires avec deux pseudogènes (Ψ *NCF1*) très proches, et elle va entraîner un décalage du cadre de lecture conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré (48,51). Seulement une vingtaine d'autres mutations ont été identifiées (48,52).

Situé sur le bras long du chromosome 1q25 (53), le gène *NCF2* codant pour p67^{phox} est composé de 16 exons. 54 mutations différentes, représentant moins de 5 % des cas de CGD, sont décrites dans l'article de Roos *et al.* (48) mais quelques mutations ont récemment été mises en évidence (54–57).

Concernant la protéine p22^{phox}, codée par le gène *CYBA* localisé sur le bras long du chromosome 16 (16q24) et formé de 6 exons (18), 55 mutations ont été répertoriées jusqu'à 2010 (48) et aucune nouvelle mutation n'a été décrite depuis.

Un seul cas rapporté en 2009, touchant le gène *NCF4* localisé sur le bras long du chromosome 22 (22q13) comportant 10 exons (58) : il s'agit de deux mutations, localisées chacune sur un allèle hérité d'un des parents (59).

4. Physiopathologie de la CGD

Les patients atteints de CGD vont présenter généralement avant l'âge de 2 ans, des manifestations infectieuses à répétition par des agents pathogènes opportunistes, associées à des manifestations inflammatoires, avec une très grande diversité des organes atteints. Le tableau clinique est très hétérogène d'un patient à l'autre tant dans l'expression que dans la gravité, avec des formes CGDX généralement plus sévères que les formes de transmission autosomique récessive (17). Ceci est dû à l'absence de cytochrome b_{558} , élément rédox du complexe oxydase. Les CGDAR avec mutations du gène *CYBA* affectant $p22^{phox}$ entraînent également l'absence de synthèse du cytochrome *b*. Elles sont donc aussi de formes cliniques sévères avec un taux de mortalité de 3-5 % par an (60). Les patients présentant une déficience de $p67^{phox}$ semblent avoir une mortalité plus élevée que les formes $p47^{phox}$ (61) qui, elles, ont un taux de mortalité de 1-2 % par an (62). Ceci s'explique par le fait que la protéine $p67^{phox}$ (activateur) est essentielle au fonctionnement optimal du complexe NADPH oxydase avec une interaction spécifique avec NOX2, alors que $p47^{phox}$ joue uniquement un rôle d'organisateur de l'assemblage de ce complexe (63).

Les manifestations infectieuses sont induites spécifiquement par des bactéries et des agents fongiques « catalase positive » (qui dégradent alors leur propre H_2O_2 , l'empêchant de réagir avec la MPO des phagocytes pour former des dérivés toxiques comme l'acide hypochloreux microbicide). Les principaux agents bactériens rencontrés sont *Staphylococcus aureus*, des entérobactéries (*Salmonella*), *Nocardia* spp., *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*... 50 % des infections retrouvées chez les patients CGD sont d'origine fongique. Les champignons du genre *Aspergillus* sont responsables de 33 % de ces infections fongiques, avec un fort taux de mortalité s'élevant à 30-40 % (64). Les champignons du genre *Candida* spp. sont également retrouvés dans 6 % des cas environ (61).

Les patients CGD présentent généralement un tableau clinique complexe avec des atteintes multiviscérales. Des infections pulmonaires sont présentes dans près de 80 % des cas : aspergilloses pulmonaires invasives dues à *Aspergillus* spp. chez 1/3 des patients mais également pneumonies dues à *B. cepacia*, *S. aureus*, *Nocardia* spp. et même des mycobactéries dans les régions endémiques, pouvant conduire à une fibrose pulmonaire. La peau est le second site le plus fréquent : abcès, acné

ou lésions eczématiformes sont principalement dus à *S. aureus* ; mais des BCGites après vaccination par le Bacille Calmette-Guérin (BCG) apparaissent dans environ 8 % des cas (61). Des atteintes des ganglions lymphoïdes (lymphadénites notamment au niveau de l'aire cervicale, pouvant évoluer vers l'abcédation et la fistulation) sont souvent dues à *S. aureus*, et il existe également des formes de lymphadénites nécrosantes graves causées par *Granulibacter bethesdensis*, un pathogène émergent récemment identifié (65,66). Des abcès récurrents du foie (dus à *S. aureus* dans 90 % des cas) surviennent chez 35 % des patients (2). Au niveau des os, des infections ostéoarticulaires, primaires ou secondaires, associées ou non à une pneumopathie, peuvent être causées par *A. fumigatus*, *S. marcescens* et *S. aureus*. Des septicémies, ou d'autres atteintes comme sinusites, otites, abcès dentaires, infections neuroméningées (bien que rares) peuvent également être retrouvées (61).

Ces infections bactériennes et fongiques sévères et répétitives s'accompagnent d'une réponse inflammatoire persistante dérégulée et surtout exagérée. Les manifestations cliniques de cette inflammation chronique sont variées et incluent ulcérations de la peau, colites, formation de granulomes, maladies auto-immunes... Les foyers inflammatoires de type granulomateux se forment dans différents parenchymes et ont généralement une taille de quelques millimètres mais peuvent parfois être plus importants, évoquant un tableau pseudotumoral. Ils sont formés de cellules géantes, multinucléées, résultant de la fusion de macrophages ayant phagocyté des bactéries mais ne les ont pas détruites. 50 % des patients développent des granulomes (60) qui sont parfois suffisamment larges pour provoquer des obstructions, notamment dans le tractus gastro-intestinal et plus rarement dans le système génito-urinaire ou la rétine (2). Les manifestations auto-immunes observées chez les patients CGD sont de type lupus érythémateux systémique, lupus discoïde, thrombocytopénie idiopathique, ou une maladie inflammatoire de l'intestin mimant cliniquement et histologiquement une maladie de Crohn, et touchant 1/3 des patients (67).

Ces sites inflammatoires sont fréquemment retrouvés stériles et ne résulteraient donc pas de la persistance d'une infection (17,68). Les mécanismes sous-jacents de cette hyperinflammation sont peu connus. Les patients CGD présenteraient une production augmentée de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1, IL17) avec une incapacité des cellules phagocytaires à les dégrader. L'apoptose des neutrophiles ainsi que leur internalisation par les macrophages sont également défectueuses, et peuvent conduire à la nécrose des neutrophiles et au relargage de protéases et dérivés oxydants intracellulaires (69).

Les porteurs des formes CGDAR sont asymptomatiques. Les femmes vectrices de la forme CGDX ne présentent généralement pas de manifestations infectieuses sévères. Cependant, des manifestations auto-immunes de type lupus sont fréquemment retrouvées (70), ou également des

stomatites aphteuses, gingivites et des rashes photosensitifs. Dans des cas extrêmement rares, lorsqu'il y a une inactivation importante du chromosome X sain chez certaines mères vectrices, les manifestations cliniques d'infections peuvent être sévères (71).

5. Diagnostic

5.1. Diagnostic clinique

La CGD est généralement diagnostiquée avant l'âge de 1 an et suspectée devant des épisodes infectieux répétés mettant en jeu le pronostic vital et pouvant être associés à un retard de croissance. Une bécégite et un retard dans la chute du cordon sont souvent observés et peuvent orienter le diagnostic. Les formes CGDX, plus graves et plus précoces, seront diagnostiquées plus tôt (2). Certaines formes de CGD (CGDAR47⁰, CGDX⁻) peuvent également être découvertes chez des sujets adultes (72), ce retard diagnostique pouvant s'expliquer par la fréquence modeste des manifestations infectieuses (64). 15-20 % de tous les cas de CGD sont des filles (1,61).

5.2. Diagnostic fonctionnel classique

La confirmation du diagnostic de la CGD est réalisée par mesure de l'activité NADPH oxydase des phagocytes purifiés à partir d'un prélèvement de sang total. Il repose sur des tests mesurant l'activité de la NADPH oxydase des neutrophiles activés par différents agents solubles (PMA, fMLP) ou particuliers (zymosan, billes de latex, *S. aureus* opsonisé...).

Le test le plus ancien est le test de réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT) sur lame. La production d'anions superoxyde après activation de la NADPH oxydase va réduire le NBT (couleur jaune) en un précipité insoluble de formazan bleu/violet/noir. Les phagocytes activés sont étalés sur lame et comptés selon qu'ils aient réduit ou non le NBT. Il s'agit donc d'une analyse semi-quantitative qui permet de poser immédiatement le diagnostic de CGD et de détecter les sujets vecteurs qui posséderont une mosaïque de cellules.

Actuellement, l'oxydation de la sonde dihydrorhodamine 123 (DHR123) fluorescente par la production de H₂O₂ mesurée par cytométrie de flux tend à détrôner l'utilisation du test de réduction du NBT. La mesure est plus rapide et nécessite un nombre très faible de cellules ou de sang total. Les résultats de ce test très sensible posent non seulement le diagnostic de CGD ou de vectrices de CGDX (2 populations distinctes de phagocytes), mais peuvent également orienter le génotype : les formes CGDAR47 et CGDX⁻ génèrent une quantité de peroxyde d'hydrogène faible mais détectable par le test

DHR (63). Il est à noter que d'autres pathologies, et notamment la déficience en myéloperoxydase (73), peuvent perturber l'interprétation des résultats de ce test car l'oxydation de la DHR nécessite la métabolisation de H_2O_2 .

5.3. Diagnostic biochimique

Le diagnostic de la forme de CGD repose sur l'identification de la protéine mutée impliquée (et donc du gène) et se fait par immunodétection (Western Blot) grâce à des anticorps spécifiquement dirigés contre les différentes protéines du complexe oxydase (64). En effet, la plupart des mutations dans les différents gènes de la NADPH oxydase entraîne l'absence d'expression de la protéine correspondante (défaut de synthèse de l'ARN messenger ou manque de stabilité de la protéine mutée). Cependant, cette technique ne permet pas de distinguer entre des mutations dans *CYBB* codant gp91^{phox} ou dans *CYBA* codant p22^{phox} puisque l'absence de l'une des deux sous-unités conduit à l'absence de l'autre. Le sexe de l'enfant (si c'est une fille) ainsi que l'activité normale des neutrophiles de la mère pourront orienter le diagnostic vers la forme CGDAR22⁰.

L'amélioration des techniques de diagnostic a conduit au développement de nouveaux tests plus rapides pour détecter les sous-unités de la NADPH oxydase par cytométrie en flux (74,75).

5.4. Diagnostic génétique

Le diagnostic fonctionnel et biochimique permet la détermination du gène déficient à l'origine de la CGD. Ensuite, la recherche de mutations ponctuelles ou délétions/insertions courtes peut se faire dans un premier temps par transcription reverse de l'ARNm du patient et amplification par PCR de la totalité de la région codante puis séquençage direct. Enfin, si la mutation à l'origine de la CGD a pu être identifiée, elle est impérativement confirmée dans le gène correspondant (ADN génomique). D'autres techniques de recherche directe sur le gène impliqué (CGH array ou FISH) sont utilisées en cas d'absence de l'ARNm ou lors d'importantes perturbations du gène (57,76).

Le génotypage n'est pas nécessaire pour la prise en charge du patient. Après détermination de la mutation génique du cas index, il permet l'identification des femmes vectrices (forme liée à l'X) ou la recherche de l'état porteur chez les parents et apparentés (formes AR). Cela permet une étude familiale mais surtout de proposer aux parents, dans le cadre du conseil génétique, la possibilité d'un diagnostic anténatal lors d'une prochaine grossesse. En effet, le diagnostic moléculaire par séquençage direct de l'ADN fœtal peut être réalisé sur des amniocytes ou des villosités choriales (prélèvement trophoblastique à 11 semaines d'aménorrhées).

6. Les modèles d'étude de la CGD

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires du dysfonctionnement du complexe NADPH oxydase dans le contexte de la CGD et pour tester de nouvelles approches thérapeutiques de la maladie, des modèles cellulaires et animaux sont nécessaires. Les neutrophiles isolés du sang étant incapables de proliférer et possédant une très courte durée de vie (environ 6h), il est donc nécessaire de recourir à des modèles cellulaires plus facilement accessibles et manipulables. Les modèles animaux mimant fidèlement la physiopathologie complexe des différentes formes de CGD présentent un intérêt tout particulier pour étudier les mécanismes infectieux et inflammatoires mis en jeu dans la CGD, mais aussi pour tester *in vivo* les approches thérapeutiques développées sur les modèles cellulaires dans un premier temps, notamment la thérapie génique.

6.1. Les modèles cellulaires

6.1.1. Les lymphocytes B immortalisés par le virus d'Epstein-Barr (LB-EBV)

Aucune implication des lymphocytes B dans la physiopathologie de la CGD n'a pu être mise en évidence. Cependant, tous les composants de la NADPH oxydase sont présents et ils possèdent une enzyme fonctionnelle capable de générer des anions superoxyde après activation (77). L'immortalisation des lymphocytes B de patients CGD par le virus d'Epstein Barr permet d'obtenir des lignées lymphoblastoïdes LB-EBV pérennes. L'activité oxydase des LB-EBV stimulés est 100 fois plus faible que celle ces neutrophiles (78). Cette activité diminuée s'explique par une quantité limitante de cytochrome b_{558} due à un blocage post-transcriptionnel empêchant la synthèse de celui-ci (79), mais aussi à une quantité plus faible de la protéine $p67^{phox}$ par rapport aux neutrophiles (80).

Les LB-EBV sont très utiles pour le diagnostic moléculaire de la CGD (analyse de l'ARN et de l'ADN génomique) (81). Ils ont également servi à l'étude du cytochrome b_{558} (78) et ont été utilisés pour les premiers essais de thérapie génique (82,83).

6.1.2. La lignée promyélocytaire PLB-985

Cette lignée promyélocytaire a été établie en 1987 à partir de cellules du sang périphérique d'une patiente atteinte de leucémie aiguë myéloïde en phase de rechute (84). Les cellules PLB-985 sont des myélomonoblastes pouvant facilement être différenciés *in vitro* en polynucléaires neutrophiles ou en monocytes/macrophages matures par des agents chimiques inducteurs. Par exemple, le diméthylformamide (DMF) ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) permettent la différenciation granulocytaire (84,85), et le PMA la différenciation monocyttaire (84). La différenciation des PLB-985

en neutrophiles est associée à une expression accrue de gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} and p40^{phox} (86). Cependant, l'activité de la NADPH oxydase reste modeste par rapport aux neutrophiles (10 fois moins importante) due à l'expression limitante du cytochrome *b*₅₅₈ (87). De plus, l'activité bactéricide est faible et certains agents particuliers comme les billes de latex opsonisées par les IgG sont très peu actifs (88). Morphologiquement, les PLB-985 différenciés ressemblent à des neutrophiles. Cependant, ils ne possèdent que les granules primaires azurophiles et ont un pouvoir de phagocytose relativement limité (89).

En 1993, l'équipe du Pr Mary Dinuer a établi une lignée PLB-985 dans laquelle le gène *CYBB* codant gp91^{phox} a été inactivé par recombinaison homologue et insertion d'une cassette de résistance (phosphotransférase hygromycine B) au niveau du 3^{ème} exon (PLB-985 KO) (90). La création de cette lignée permet ainsi de générer en culture des cellules pseudo-neutrophiles de type CGDX⁰ déficients en cytb₅₅₈ et donc incapables de produire des anions superoxyde. La transfection de ces PLB-985 KO avec de l'ADNc de gp91^{phox} restaure totalement leur capacité à produire les ions superoxyde (87,90). La modélisation des variants CGDX⁻ par des techniques de mutagenèse dirigée permet l'étude des mécanismes de synthèse et de maturation de gp91^{phox} alors que celle des formes CGDX⁺ permet de découvrir des régions fonctionnelles de la protéine (91,92).

6.1.3. Les cellules K562

Obtenues à partir d'un patient atteint de leucémie myéloïde chronique (93), les cellules K562 sont des cellules malignes hautement indifférenciées, multipotentes et précurseurs de la lignée hématopoïétique. Elles peuvent ainsi être différenciées, spontanément ou après stimulation, en précurseurs des cellules érythrocytaires (94), granulocytaires (95) ou mégacaryocytaires (96). De plus, elles expriment constitutivement des niveaux normaux de protéine p22^{phox} (97) ainsi que Rac2. Transfectées avec des vecteurs codant les sous-unités gp91^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox}, elles génèrent 4 fois plus d'ions superoxyde après stimulation que les LB-EBV ; elles ont surtout été utilisées pour l'étude des interactions protéiques entre les différents constituants de la NADPH oxydase (98).

6.1.4. Les autres modèles cellulaires non phagocytaires

Les cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*), issues de biopsie d'ovaires de hamster, et les fibroblastes murins NIH 3T3 ne contiennent ni gp91^{phox} ni p22^{phox} mais ces lignées cellulaires sont facilement transfectables et elles ont été très utilisées pour étudier les interactions entre les deux sous-unités, l'incorporation de l'hème et la fonctionnalité du cytb₅₅₈ (99).

Les cellules COS-7 sont des cellules fibroblastiques de rein de singe exprimant Rac1. Elles sont facilement cultivables et transfectables, avec un taux d'expression protéique important. Leur transfection avec les sous-unités du complexe oxydase a permis d'étudier l'incorporation de l'hème (20) et son rôle dans l'assemblage du cytochrome b_{558} (100), ainsi que le burst respiratoire (101).

La lignée cellulaire HEK 293 (*Human Embryonic Kidney*) a été générée à partir de cellules embryonnaires rénales humaines transfectées avec de l'ADN d'adénovirus type 5 (102). Exprimant de façon endogène $p22^{phox}$, ces cellules ont permis, après transfection transitoire ou stable, d'étudier le rôle et le mode d'activation des différents analogues des NOX (103–105).

6.2. Les modèles animaux

6.2.1. Modèle CGDX

En 1995, l'équipe du Pr Mary Dinayer a généré un modèle murin de CGD liée à l'X par recombinaison homologue au niveau du gène *CYBB* sur le chromosome X dans les cellules souches embryonnaires murines (106). La transmission à la génération suivante est assurée par les femelles vectrices caractérisées par deux populations de neutrophiles. Les souris mâles hémizygotes CGDX présentent un phénotype similaire à celui retrouvé chez les patients humains CGDX : absence de la sous-unité $gp91^{phox}$, incapacité à produire des ions superoxyde et susceptibilité accrue aux infections bactériennes (*S. aureus*) et fongiques (*A. fumigatus*).

6.2.2. Modèle CGDAR47

Utilisant le même principe basé sur la recombinaison homologue, des cellules souches embryonnaires murines ont été transfectées avec un vecteur ciblant l'exon 7 du gène codant $p47^{phox}$ (107). Les souris $p47^{phox-/-}$ produisent des neutrophiles incapables de générer des ions superoxyde ou de détruire *S. aureus in vitro*. Comme chez les patients CGD, ces souris développent spontanément des infections sévères et leur réponse inflammatoire est excessive et dérégulée avec développement de granulomes aux sites d'infection.

Les modèles souris CGDX et CGDAR47 ont été largement utilisés pour l'étude de la physiopathologie de la CGD lors d'infections par des pathogènes spécifiques ainsi que le développement de traitements comme la thérapie génique (108–110).

6.2.3. Modèle CGDAR22

Récemment identifiée, la lignée murine *nmf333* représente le 1^{er} modèle animal de la forme CGDAR22 (111). Elle a été créée au Laboratoire Jackson dans le cadre d'un projet de mutagenèse induite par l'éthyl nitrosourée, un agent chimique mutagène. Une mutation ponctuelle T>C dans l'exon 5 du gène *CYBA* codant la sous-unité $p22^{phox}$ conduit à la substitution d'une tyrosine par une histidine (Y121H) au niveau de la seconde hélice transmembranaire de la protéine, entraînant des conséquences structurales importantes touchant la synthèse ou la stabilité de $p22^{phox}$. Cette mutation est ainsi responsable d'un phénotype particulier associant syndrome de CGD et anomalie sévère de l'équilibre (déficit de la coordination motrice et vestibulaire). En effet, la protéine $p22^{phox}$ est associée à NOX3 au niveau de l'oreille interne (104). Ce modèle animal a servi à étudier pour la première fois l'infection pulmonaire à *B. cepacia*, pathogène opportuniste causant des pneumonies nécrosantes fatales en 3 jours chez toutes les souris *nmf333* homozygotes. L'expression transgénique ubiquitaire de l'ARNm codant $p22^{phox}$ chez ces souris a permis de rétablir l'activité oxydase dans les neutrophiles, et donc l'immunité anti-infectieuse contre *B. cepacia*, ainsi que leur capacité d'équilibre.

A ce jour, aucun modèle de cellules phagocytaires humaines de CGD autosomale récessive n'existe. De même, aucun modèle animal mimant les CGDAR67 et CGDAR40 n'est disponible. L'absence de ces modèles limite l'exploration de ces formes moins courantes de CGD ainsi que le développement de traitements adaptés.

L'utilisation des modèles animaux dans les essais de thérapie seront exposées dans le paragraphe 7. Prévention et traitements.

7. Prévention et traitements

7.1. Prise en charge des patients CGD

Il est indispensable de mettre en place quelques règles d'hygiène pour éviter l'exposition aux agents infectieux : lavage soigneux et désinfection des blessures, soins de bouche... Ne pas fumer, éviter l'utilisation d'humidificateurs et éviter les zones à risque d'*Aspergillus* (sites de construction, fermes, étables...) peuvent permettre la prévention des infections pulmonaires. De même, la vaccination est recommandée pour la varicelle, la rougeole et la grippe. Par contre, la vaccination BCG est contre-indiquée à cause du risque de développer une bécégite locale, voire disséminée (tuberculose pulmonaire) (112).

Des visites médicales régulières sont également indispensables pour détecter les premiers signes d'infections ou de complications. Les problèmes préoccupants à l'âge adulte sont plus souvent d'ordre inflammatoire, à distance des infections. Ces lésions inflammatoires imposent un suivi régulier sur le plan pulmonaire (radiographie et scanner thoraciques, exploration fonctionnelle respiratoire), rénal (clairance de la créatinine, analyse du sédiment urinaire, échographie de l'appareil urinaire) et hépatique (bilan biologique hépatique, échographie, recherche de signes d'hypertension portale) (64).

La prise en charge thérapeutique est la même quelle que soit la forme de CGD. Elle repose sur une chimioprophylaxie antimicrobienne tout au long de la vie mais nécessite une bonne compliance des patients, associée au traitement des infections aiguës. La seule thérapie curative est la transplantation de moelle osseuse/cellules souches hématopoïétiques, mais d'autres approches thérapeutiques sont en développement et leurs avancées seront détaillées plus loin.

7.2. Chimioprophylaxie

Compte-tenu de la gravité de certains épisodes infectieux et de l'émergence de pathogènes, la chimioprophylaxie doit être maintenue à vie. Elle associe médicaments antibactériens et antifongiques, et éventuellement interféron gamma.

▪ Les antibactériens

Préconisée en 1^{ère} intention, l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-SMX) possède un spectre d'activité dirigé contre les bactéries Gram + et -, ce traitement est donc actif contre la plupart des pathogènes bactériens fréquemment rencontrés (*S. aureus*, *Nocardia* spp, *S. marcescens* et *B. cepacia*). Son utilisation a permis de réduire le taux d'infections bactériennes sévères d'au moins 50 % chez les patients CGD (et plus particulièrement celles dues à *S. aureus*), aussi bien dans les formes X que AR (113). La fréquence d'infections majeures a été réduite de 1 par an à 1 tous les 3,5 ans environ (114). Généralement bien toléré sans affecter la flore intestinale, l'utilisation du TMP-SMX n'a pas induit d'augmentation des infections fongiques ou l'émergence de pathogènes résistants malgré sa très large utilisation. En cas de réaction allergique aux sulfamides, il est possible d'utiliser le triméthoprime seul, ou la dicloxacilline. En cas de contre-indication, la ciprofloxacine est une bonne alternative (115).

La prophylaxie des femmes enceintes atteintes de CGD est problématique puisque le triméthoprime, antagoniste de l'acide folique, doit être interrompu lors de la grossesse à cause du risque de malformations congénitales. En ce qui concerne le sulfaméthoxazole, il n'est pas connu

pour induire ce genre de risque et le cefuroxime peut donc être utilisé à la place du triméthoprim chez la femme enceinte (112).

▪ Les antifongiques

Le médicament antifongique de choix est l'itraconazole. Sa grande efficacité notamment contre les infections dues à *Aspergillus* spp. a permis de réduire l'incidence des infections fongiques aussi bien superficielles que plus graves comme les aspergilloses pulmonaires invasives (116). Sa tolérance au long cours est très bonne avec peu d'effets secondaires (seulement rash ou maux de tête).

Mais depuis quelques années, des souches d'*A. fumigatus* résistantes aux azolés (itraconazole, voriconazole et sensibilité diminuée au posaconazole) ont émergé (117).

▪ L'interféron gamma (IFN γ)

Les premiers essais d'utilisation *in vitro* et *in vivo* de l'interféron gamma ont montré que cette cytokine immunomodulatrice pouvait restaurer partiellement l'activité de la NADPH oxydase et améliorer l'activité bactéricide des neutrophiles et monocytes circulants (118,119). L'effet maximal apparaissant 14 jours après l'injection sous-cutanée et persistant 28 jours a également fait suggérer un effet sur les progéniteurs myéloïdes (120).

Basée sur ces résultats, une étude multicentrique randomisée en double-aveugle (phase III) a montré en 1991 que l'administration prophylactique d'IFN γ à une dose 50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ en sous-cutané 3 fois/semaine pendant 1 an sur des patients CGDX et CGDAR permettait la réduction de la fréquence et de la sévérité des infections de 70 %. Pourtant, aucune augmentation d'expression du cytochrome *b*, du métabolisme oxydatif ou de l'activité bactéricide n'a pu être mise en évidence (121). D'autres études ont confirmé l'efficacité de cette prophylaxie par IFN γ , ainsi que sa bonne tolérance à long terme chez l'Homme (essais de phase IV) (122–124) mais également chez des souris CGD p47^{phox -/-} (125), en excluant également la restauration de l'activité oxydase comme mécanisme d'action. Différentes hypothèses ont été proposées : augmentation de la transcription de la sous-unité gp91^{phox} du cytochrome *b*₅₅₈, mais également des autres gènes impliqués dans l'activité NADPH oxydase (119), augmentation de la fidélité de l'épissage et de l'export du noyau des transcrits normaux dans le cas de CGDX causées par des mutations introniques au niveau de sites d'épissage (126,127), implication de voies antimicrobiennes indépendantes de l'oxydase, augmentation de la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages (108), augmentation de la fonction de lymphocytes T et/ou B (128). Au contraire, d'autres études ne montrent aucun bénéfice de l'ajout d'IFN γ à la prophylaxie classique (129,130).

En conclusion, en raison de ces résultats contradictoires, du coût et des modalités d'administration contraignantes, et malgré des effets indésirables mineurs (maux de tête et fièvre dans les heures suivant l'administration), l'utilisation de l'IFN γ est proposée uniquement chez les patients qui, malgré la prophylaxie antimicrobienne, développent des infections sévères (12). Par contre, chez des patients traités en prophylaxie par de l'IFN γ , celui-ci doit être arrêté au moins 4 semaines avant la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) car il augmente l'expression des antigènes du système HLA (12).

7.3. Traitement des épisodes infectieux aigus

Le traitement des infections aiguës au cours de la CGD repose sur l'antibiothérapie, les antifongiques et, exceptionnellement, la transfusion granulocytaire.

▪ L'antibiothérapie

Initialement probabiliste, l'antibiothérapie doit être « agressive » et synergique : les antibiotiques choisis doivent couvrir un large spectre de bactéries incluant *Burkholderia* spp., *S. aureus*, *Nocardia* spp... La ciprofloxacine en intraveineux est ainsi l'antibiotique le plus utilisé en 1^{ère} ligne, il peut être associé à la vancomycine ou à la teicoplanine pour assurer une bonne couverture des cocci à gram +. Une fois l'agent infectieux identifié, le traitement est ajusté pour s'adapter aux résultats de l'antibiogramme. Comme ces infections répondent lentement, le traitement de l'infection aiguë est souvent prolongé pendant plusieurs mois par voie orale (12). Dans le cas des lymphadénites nécrosantes causées par *G. bethesdensis*, une bactérie gram négative multirésistante, de la ceftriaxone est administrée de façon prolongée, associée ou non à la chirurgie (131).

▪ Les traitements antifongiques

Remplaçant l'amphotéricine B responsable d'insuffisances rénales progressives chez les patients CGD, l'itraconazole est devenu le traitement antifongique de référence. Ainsi, en plus de son utilisation en prophylaxie, l'itraconazole s'est révélé très utile en curatif après échec du traitement conventionnel dans les ostéomyélites, l'aspergillose pulmonaire invasive et les affections fongiques du système nerveux central (64). Les triazolés de seconde génération (voriconazole, posaconazole et caspofungine) ont montré leur efficacité pour les infections fongiques invasives réfractaires aux traitements de référence (132,133) et, alors que les infections fongiques notamment dues à *Aspergillus* étaient la cause principale de mortalité des patients CGD (2), ces nouveaux antifongiques ont complètement modifié le pronostic de ces infections avec une mortalité maintenant faible.

- **La chirurgie**

Des gestes chirurgicaux sont parfois nécessaires chez les patients CGD, avec notamment le drainage percutané et/ou l'excision chirurgicale d'abcès ; c'est par exemple le cas pour les abcès du foie, denses et difficiles à drainer (134). La chirurgie est également utile dans les cas d'obstruction (hydronéphrose secondaire à un granulome au niveau de l'uretère) ou de lésions granulomateuses et suppuratives (du foie et du poumon par exemple). Malheureusement, les sites opératoires peuvent s'infecter, guérissent généralement très lentement et forment souvent des fistules (67). La prise en charge post-opératoire de ces patients est donc très importante et repose sur l'utilisation prolongée d'antibiotiques/antifongiques et, dans certains cas très graves, de transfusions de globules blancs (134,135).

- **La corticothérapie**

Les corticostéroïdes comme la prednisolone permettent de maîtriser assez efficacement les désordres inflammatoires et complications obstructives rencontrés chez les patients CGD, et cela avec une bonne tolérance et de faibles complications infectieuses quand utilisés à faibles doses et sur une courte durée. Mais à long terme, ils peuvent entraîner des complications telles que retard de croissance, ostéoporose et risque infectieux (2) ; et l'itraconazole utilisé en prophylaxie doit être remplacé par le voriconazole car son effet inhibiteur du cytochrome P450 3A4 empêche la dégradation des stéroïdes (67).

Dans certains cas d'abcès du foie récurrents et réfractaires à la chirurgie, la corticothérapie peut être la seule alternative (136).

Les colites sont des manifestations inflammatoires très difficiles à traiter. En cas de colites réfractaires au traitement conventionnel, sulfasalazine ou prednisolone en 1^{ère} intention (137), la corticothérapie est associée à d'autres molécules comme l'azathioprine (112,138), la ciclosporine (17,139) ou des agents anti-TNF α . Le thalidomide, entre autre par son effet anti-TNF α , a montré une bonne efficacité sur les colites réfractaires (140) et, contrairement à la ciclosporine, son administration ne serait pas associée à une augmentation du risque infectieux (141).

- **Les anti-TNF α**

Les mécanismes sous-jacents de l'inflammation sont peu connus mais il a été rapporté une élévation des cytokines pro-inflammatoires chez les patients CGD, en particulier le TNF α dont le rôle n'est pas encore élucidé. Les anticorps monoclonaux bloquant le TNF α , parmi lesquels on peut citer l'infliximab, se sont révélés très efficaces et suppriment rapidement les symptômes des maladies

inflammatoires de l'intestin (142). L'infliximab est ainsi préconisé en traitement court de seconde ligne dans les colites réfractaires aux stéroïdes (143). Cependant, leur administration à long terme est contre-indiquée à cause du risque infectieux notamment aux pathogènes opportunistes caractéristiques de la CGD (112). L'apparition de complications graves, voire fatales, lors de l'utilisation d'agents anti-TNF α , et cela malgré un traitement prophylactique agressif, remet en cause leur effet bénéfique et ils doivent être maniés avec précaution (144).

▪ La transfusion de concentrés granulocytaires

Initiée au cours des années 1960 pour les neutropénies liées au traitement des hémopathies, la transfusion de globules blancs est apparue comme une option thérapeutique complémentaire intéressante dans le cadre de la CGD. Lors des 20 dernières années, de nombreux cas reportés dans la littérature ont montré l'intérêt de son utilisation dans le cas d'infections bactériennes et fongiques sévères mettant en jeu le pronostic vital et résistant aux traitements ainsi qu'à la chirurgie (76,135,145,146). Une méta-analyse de 8 essais contrôlés et randomisés réalisés entre 1970 et 1995 a montré que les résultats varient en fonction de la compatibilité leucocytaire avant transfusion, la dose de granulocytes injectée et la durée de neutropénie (147).

Ces transfusions sont généralement bien tolérées mais des effets secondaires peuvent apparaître (148) : réactions de type frisson-hyperthermie, ou, plus rarement, une leucostase pulmonaire notamment lorsque l'injection est réalisée trop rapidement ou concomitante avec l'administration d'amphotéricine B. Le risque d'allo-immunisation anti-érythrocytaire, anti-HLA, voire anti-leucocytaire (suite à l'apparition de leuco agglutinines conduisant à une rapide perte des granulocytes transfusés), ainsi que la réaction de greffon contre l'hôte (GVHD), sont également à prendre en compte, notamment pour les patients susceptibles de recevoir dans le futur une transplantation de moelle osseuse allogénique. L'allo-immunisation anti-HLA ou anti-leucocytaire est un phénomène très fréquent (jusqu'à 78 % des patients) et qui se développe rapidement dans les heures suivant l'injection ; l'apparition de ce phénomène peut être évalué très facilement par le test DHR (149). L'apparition d'une allo-immunisation impose l'arrêt des transfusions et pourrait compliquer une potentielle transplantation de CSH (149). Il existe également un risque viral : transfert de cytomégalovirus (CMV) par l'intermédiaire des neutrophiles du donneur infectés (67).

En conclusion, cette thérapeutique controversée tend à disparaître depuis le développement des nouveaux médicaments antifongiques très efficaces. Elle peut cependant rester un traitement de dernier recours dans le cas où toutes les autres options thérapeutiques ont échoué.

7.4. La transplantation de moelle osseuse/cellules souches hématopoïétiques

Actuellement, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) non modifiées issues de la moelle osseuse ou du sang de donneur sain est le seul traitement curatif reconnu de la CGD. En théorie, une transplantation conduisant à une population myéloïde mixte chimérique stable chez le receveur peut conduire à une rémission totale. Elle n'est réalisée que chez des patients pour lesquels il existe un donneur HLA-compatible, même si plusieurs essais ont été réalisés à l'aide d'un donneur HLA non compatible (150). La préparation des donneurs est la même que celle pour la transfusion de concentrés granulocytaires : administration de G-CSF et ou corticoïdes, puis aphérèse et sélection des cellules CD34⁺.

Depuis les 1^{ère} transplantations de moelle osseuse allogénique à partir de 1976 (151,152), de nombreux cas ont été publiés (153–155). Les modalités des transplantations ont progressivement évolué et ont permis d'améliorer l'efficacité de la greffe.

Le traitement conventionnel du receveur est myéloablatif et repose généralement sur l'utilisation du busulfan à forte dose (associé ou non à des molécules comme le cyclophosphamide, le melphalan...). Dans la 1^{ère} large étude rétrospective européenne incluant 27 patients (en majorité des enfants) ayant subi une transplantation entre 1985 et 2000, Seger *et al.* ont montré que la guérison était obtenue pour 81 % des patients, ceux-ci présentant > 95 % de cellules myéloïdes du donneur circulantes. Les infections préexistantes et les lésions inflammatoires chroniques ont été résolues chez la plupart des patients survivants greffés. Dans cette étude, 7 patients ont développé une GVHD (grade 2 à 4) aiguë ou chronique, et d'autres ont subi des réactivations d'inflammations aux sites d'infection. Les 4 patients morts (15 % mortalité) présentaient tous une infection fongique réfractaire au moment de la transplantation (156).

Malgré une bonne survie globale des patients et une réussite encourageante, la morbidité reste élevée chez les patients CGD fragiles présentant des infections incurables ou des inflammations au moment de la transplantation. De plus, le conditionnement myéloablatif présente plusieurs inconvénients : lésions tissulaires, longues périodes de neutropénie et stérilité. En parallèle à l'étude précédente débutée en 1985, des mini-conditionnements non myéloablatif moins toxiques ont été tentés dans certains essais de transplantation (157). Ils peuvent associer busulfan à dose réduite, cyclophosphamide, fludarabine... Ainsi un essai de mini-conditionnement non-myéloablatif suivi d'une greffe de cellules souches HLA génodentique a été réalisé chez 10 patients CGD en 2001 (158). Le greffon a été déplété en cellules T, réduisant alors le risque de GVHD sévères (notamment chez les enfants) mais augmentant le risque de rejet de greffe. Les patients ont donc été injectés avec des lymphocytes du donneur (DLI : *donor lymphocytes infusion*) pour réduire le risque de rejet et

améliorer le chimérisme. Cependant, malgré le fait que cette stratégie de conditionnement non-myéloablatif suivi de DLI avait déjà montré son intérêt chez un jeune patient CGDX (159), le taux de rejet s'est révélé élevé (20 %) ainsi que le taux de mortalité (30 %, uniquement des adultes). En conclusion, malgré la diminution de toxicité liée au conditionnement, cette stratégie reste risquée et limitée aux patients sans infections déclarées au moment de la transplantation.

Au contraire, un conditionnement subablatif chez des patients CGD à haut risque a permis un chimérisme hématopoïétique total et stable (suivi réalisé pendant 2 ans) et la guérison des 3 patients greffés (160). Ce conditionnement réduit semble donc très prometteur pour les patients CGD fragiles.

Les risques majeurs de la transplantation sont le risque infectieux qui survient au moment de la neutropénie lors de la période d'immunosuppression post-transplantation, le rejet ou la maladie du greffon contre l'hôte. Ces deux derniers peuvent être prévenus par l'administration d'immunosuppresseurs comme la ciclosporine A, le méthotrexate ou le mycophénolate mofétil (112,161).

Lorsqu'il existe un donneur HLA compatible apparenté, il est important de décider tôt dans la vie de la réalisation d'une transplantation de CSH, c'est-à-dire avant l'apparition de séquelles trop importantes des organes contre-indiquant cette option, d'autant plus que la réussite de la transplantation est plus importante chez les enfants par rapport aux adultes (2). La décision est basée sur le dossier médical du patient. Cependant, une CGD non compliquée n'est généralement pas considérée comme une indication de transplantation de CSH. A l'inverse, celle-ci est conseillée chez les patients qui ont soit des infections réfractaires ou récurrentes sévères malgré une bonne chimioprophylaxie, soit des complications inflammatoires résistantes aux stéroïdes (146,162–164).

Plus de 100 transplantations ont ainsi été réalisées avec succès : la grande majorité d'entre elles avec des donneurs apparentés (issus de la même famille, généralement un membre de la fratrie) (161) mais, depuis quelques années, des transplantations à partir de donneurs HLA-compatibles non apparentés ont également donné d'excellents résultats (150,160,164–167). Pour les patients n'ayant pas de donneurs compatibles, la transplantation de cellules souches issues de sang de cordon après conditionnement myéloablatif ou réduit représente une alternative très prometteuse (168–173), d'autant plus qu'il a été montré pour d'autres pathologies hématopoïétiques la possibilité de réaliser une greffe à partir de 2 unités de sang de cordon pour les adultes (174). Trois enfants CGDX ont même été guéris grâce à une greffe combinée de moelle osseuse et de sang de cordon ombilical d'un frère/bébé médicament sélectionné avant implantation *in utero* (175).

Les taux de survie atteignent 95 % dans le cas de greffe génoidentique et 85 % dans le cas de greffe HLA identique d'un donneur non apparenté (176). Pourtant, il reste des patients pour lesquels il n'existe aucune compatibilité HLA et qui, pour l'instant, ne peuvent bénéficier de ce traitement. Pour ceux-là, la thérapie génique peut être une option thérapeutique intéressante.

7.5. La thérapie génique

La CGD est une cible de choix pour la thérapie génique : un seul gène est atteint, il existe des modèles cellulaires et animaux pour effectuer les essais, et la correction n'a pas besoin d'être totale pour procurer une protection efficace (60).

Le principe de la thérapie génique dans la CGD consiste à intégrer une copie fonctionnelle du gène (ADNc) dans le génome des CSH du patient lui-même, afin que leur re-transplantation conduise à la génération d'une population stable et persistante de progéniteurs myéloïdes contenant le gène corrigé, et donnant naissance à des phagocytes fonctionnels et en nombre suffisant dans le sang périphérique. La Figure 4 récapitule les différentes étapes de la thérapie génique chez l'Homme.

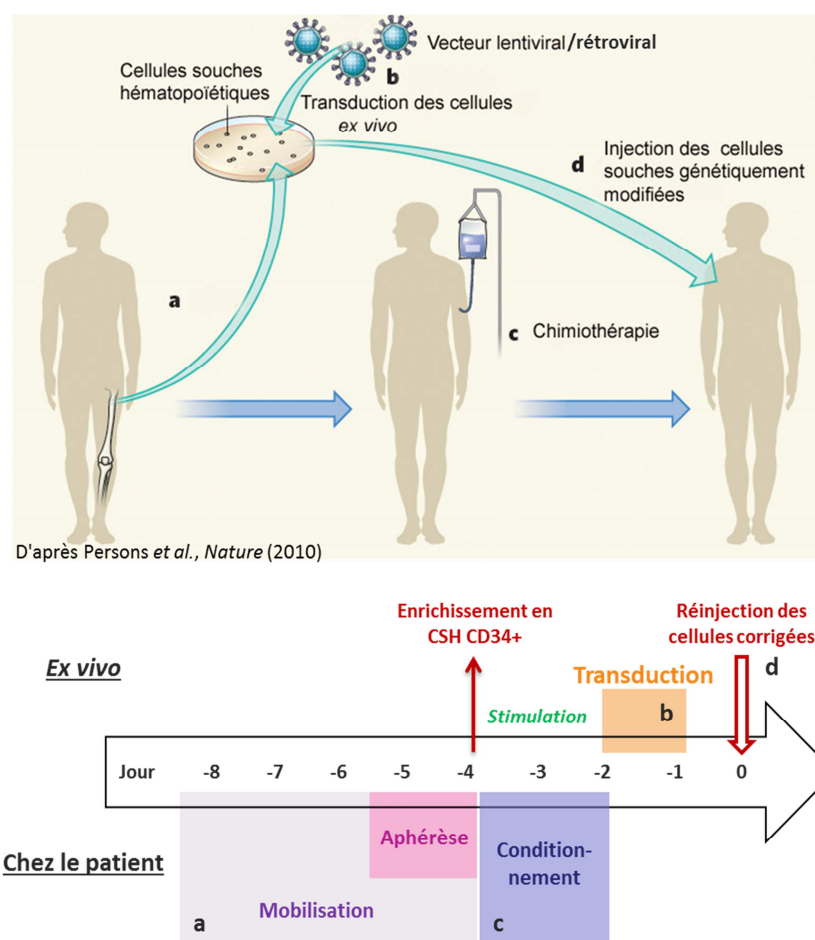


Figure 4. Le principe de la thérapie génique chez l'Homme.

L'obstacle majeur limitant le succès de la thérapie génique dans le cadre de la CGD est l'absence d'avantage sélectif de croissance des cellules corrigées qui leur permettrait de survivre et remplacer *in vivo* les cellules non corrigées (177).

▪ Les études précliniques

Les études précliniques réalisées sur les modèles cellulaires LB-EBV CGDX (82) et CGDAR47 (83,178,179), les PLB-985 (180) ou des monocytes de patients CGDAR47 (181) ont montré que la transfection de ces cellules par des vecteurs contenant une copie fonctionnelle de l'ADNc de gp91^{phox} ou p47^{phox} permettait de restaurer l'activité NADPH oxydase.

Les modèles murins CGDX (182–184) et CGDAR47 (185) ont été largement utilisés, d'une part pour évaluer l'efficacité et la durabilité de la transfection des CSH, et d'autre part, pour montrer la restauration de l'immunité anti-infectieuse après challenge bactérien (185) ou fongique (183). La probabilité d'apparition d'infections bactériennes ou fongiques a pu être corrélée avec le taux de neutrophiles fonctionnels : chez la souris, une correction de > 10% des neutrophiles est suffisante pour protéger contre les infections fongiques notamment les aspergilloses pulmonaires, mais il faut au moins 20-25 % de neutrophiles avec activité oxydase pour protéger de certaines infections bactériennes comme *B. cepacia* (186).

Des cellules CD34+ issues de la moelle osseuse ou du sang périphérique de patients CGDX (187,188), CGDAR47 (189) et CGDAR67 (190) ont été transfectées à l'aide de rétrovirus, bien que de façon moins efficace que pour les CD34+ murines (pas d'intégration dans des CSH non en phase de division et peu de récepteurs pour le virus à la surface des CSH humaines). Les cellules phagocytaires matures (neutrophiles et monocytes) différenciées *in vitro* à partir de ces cellules CD34+ corrigées sont fonctionnelles et produisent des anions superoxyde.

▪ Les essais cliniques chez l'Homme

Chez l'Homme, les deux premiers essais de phase I ont été réalisés en 1997 et 1998 chez des patients CGDAR47 et CGDX, sans conditionnement du patient et avec des injections répétées de cellules CD34+ corrigées à l'aide d'un vecteur rétroviral-γ possédant un promoteur MFGS. Un bénéfice clinique a été montré mais seulement transitoire (jusqu'à 6 mois) et avec un taux faible de neutrophiles corrigés circulants (< 1 %) (191,192). Ces résultats ont été confirmés par un autre essai réalisé par l'équipe de M. Dinayer (193). Diverses stratégies ont été évoquées pour améliorer ces résultats, telles que l'association à un conditionnement suffisant du patient et/ou l'expression d'un gène de résistance permettant l'expansion *in vivo* des cellules corrigées. En 2004, Ott *et al.* ont ainsi

utilisé un conditionnement submyéloablatif à base de busulfan à faible dose chez 2 patients, ce qui a permis d'obtenir un taux de neutrophiles corrigés circulants entre 12 et 31 % pendant les 4-5 premiers mois, permettant de résoudre les infections fongiques et bactériennes graves dont souffraient ces patients (194). Cependant, une prolifération myéloïde a été détectée à partir du 10^{ème} mois. Elle serait due à une expansion clonale induite par l'insertion du vecteur rétroviral SFFV (activateur spécifique myéloïde) dans des oncogènes (*MDS1/EVI1*, *PRDM16* et *SetBP1*), entraînant un syndrome myélodysplasique avec monosomie 7 chez ces patients (dont l'un est mort, le second a reçu une transplantation allogénique de CSH). De plus, chez ces deux patients, la méthylation du promoteur viral a conduit au *silencing* du transgène et à l'accumulation de cellules transduites mais non fonctionnelles (195). Le même protocole a été utilisé par Bianchi *et al.* en 2009 pour traiter avec succès un patient de 8,5 ans souffrant d'infection pulmonaire à *A. fumigatus* réfractaire à toute thérapie (41). Un autre essai a été initié en 2006 au NIH sur 3 patients CGDX présentant des infections réfractaires aux traitements standards. Ils ont été conditionnés avec du busulfan puis transplantés avec des cellules CD34+ corrigées à l'aide d'un vecteur rétroviral-γ MFGS (sans effet activateur myéloïde contrairement au rétrovirus SFFV). Si l'un des patients exprimait toujours 1 % de cellules corrigées 2 ans après la thérapie génique sans signe de myélodysplasie, chez le second, une clairance immunologique des cellules corrigées a été observée après 1 mois et il a finalement succombé à une infection fongique avant de pouvoir bénéficier d'une transplantation de CSH (196). Récemment, un autre essai de phase I/II à Séoul a été mis en place chez 2 patients CGDX avec une bonne efficacité initiale mais un taux de neutrophiles fonctionnels entre 0,05 et 0,21 % après 3 ans. Bien que des intégrations aient été retrouvées dans ou près des proto-oncogènes *MDS1/EVI1*, *PRDM16* et *CCND2*, aucune expansion clonale ou désordre hématologique n'ont été observés après 3 ans (197).

▪ **Les mécanismes pouvant expliquer la diminution rapide des cellules transfectées**

L'une des raisons pouvant expliquer ce phénomène est le développement d'une réponse immunitaire vis-à-vis du transgène exprimé dans tous les lignages hématopoïétiques, incluant les cellules progénitrices ainsi que les cellules présentatrices de l'antigène. Une réaction immunitaire contre cette protéine étrangère nouvellement introduite pourrait donc avoir conduit à l'élimination des cellules corrigées dans certains des essais cliniques cités précédemment (196,197). Si l'idée d'associer un traitement immunosuppresseur a paru intéressante pour promouvoir la tolérance, elle n'a toutefois pas montré d'amélioration chez un patient ayant reçu de la rapamycine (196).

La prise de greffe étant dépendante de la profondeur du conditionnement, les doses de busulfan utilisées n'étaient peut-être pas assez myéloablatives. Cependant, l'injection d'une dose trop élevée est risquée chez des patients avec une infection active au moment du traitement par thérapie génique.

Une autre hypothèse repose sur l'idée que seul un faible taux de « vraies » CSH avec une capacité de repopulation à long terme de la moelle osseuse ont été efficacement transduites (197).

- **Les améliorations pour la thérapie génique**

LA TRANSDUCTION ET LA SELECTION DES CELLULES CORRIGÉES

L'efficacité de transduction des CSH *ex vivo* étant limitée, différentes stratégies ont été tentées pour l'augmenter et prolonger la durée de la correction.

Lors de la transduction *ex vivo* des cellules CD34+, certaines équipes ont ajouté un cocktail de cytokines hématopoïétiques dans le milieu de culture (191,196,198) mais cela pourrait diminuer leur potentiel de greffage et de multipotence (de même qu'une longue durée de transfection) (199). L'utilisation de supports de culture recouverts de fragments de fibronectine humaine augmenterait également l'efficacité de transduction des cellules CD34+ (196,198,200).

L'enrichissement en CSH transfectées est possible *ex vivo* grâce à l'utilisation de gènes rapporteurs tels que le gène de la GFP (*green fluorescent protein*) (201) ou de la protéine de surface CD24 (202). Dans le cas de la CGD, la sélection de CSH transfectées donc exprimant la forme tronquée du récepteur de faible affinité pour le facteur de croissance nerveux humain (Δ LNGBR) a montré une augmentation de la proportion de neutrophiles corrigés après transplantation chez des souris receveuses (203,204). Même si aucun effet négatif n'a été observé après cette pré-sélection et l'expression d'une protéine transgénique, sa sécurité d'utilisation doit être évaluée avant toute application à l'Homme.

LES VECTEURS

Bien que l'utilisation de vecteurs intégratifs comme les rétrovirus semble la plus adaptée pour assurer une correction à long terme dans les CSH, les risques d'insertion mutagénique ou de transactivation de proto-oncogènes sont à prendre en compte. De nouveaux vecteurs ont ainsi été développés pour améliorer la sécurité de la thérapie génique.

Les vecteurs lentiviraux tels que ceux basés sur le virus HIV-1 (*human immunodeficiency virus-1*) sont très prometteurs. Ils permettent une transduction rapide et efficace dans des cellules quiescentes

comme les cellules CD34⁺ (205). Bien qu'ils soient également intégratifs, cette intégration se ferait dans des régions géniques et intergéniques et non au niveau des promoteurs ou régions régulatrices comme dans le cas des rétrovirus. Des lentivirus de type SIN (*self-inactivating vector*) ont été construits. De plus les éléments activateurs au niveau des LTR (*long terminal repeat*) ont été retirés, réduisant ainsi le risque potentiel de transactivation d'oncogènes. L'expression du transgène est sous la dépendance d'un promoteur myélo-spécifique CMV, et la preuve de son efficacité de transduction et de correction de l'activité NADPH oxydase a été faite dans des PLB-985 CGDX (206). En 2002, Roesler *et al.* ont montré une meilleure efficacité du vecteur lentiviral SIN par rapport à un rétrovirus-γ MFGS pour la correction de cellules CD34⁺ issues de patients CGDX et transplantées chez des souris NOD/SCID (20 % de neutrophiles humains corrigés vs 2,4 %) (198). D'autres études ont également utilisé des lentivirus et montré leur efficacité de correction prolongée *in vivo* (207). Les améliorations de ces lentivirus SIN portent actuellement sur la restriction de l'expression du transgène à un lignage mais également un stade de différenciation donné ; cela a été réalisé avec succès sur des souris CGDX (208).

Parmi les rétrovirus, les alpharétrovirus sont intéressants puisqu'ils peuvent intégrer des cellules en division mais également quiescentes, et de plus en induisant un profil d'intégration génomique plus neutre. La combinaison des alpharétrovirus avec le système SIN a permis d'induire une expression stable et élevée de gp91^{phox} et donc de restaurer l'activité de la NADPH oxydase dans des PLB-985 ainsi que des CSH CGDX humaines et murines *in vitro* mais également *in vivo* après transplantation des cellules CD34⁺ corrigées dans des souris CGDX (209). Au même moment, un rétrovirus-γ SIN avec un promoteur permettant une expression spécifique du transgène dans les cellules myéloïdes a montré son efficacité pour restaurer l'activité NADPH oxydase *in vivo* dans des souris transplantées par des CSH issues de patients CGDX et corrigées *ex vivo* (210). Dans ces trois précédents essais, le transgène codant gp91^{phox} a été optimisé pour augmenter l'expression de la protéine, réduisant ainsi le nombre de copies du vecteur nécessaire pour une correction efficace (211).

L'EXPRESSION SPECIFIQUE MYELOIDE

L'expression constitutive de gp91^{phox} dans les progéniteurs hématopoïétiques primitifs après thérapie génique pourrait conduire à une production inappropriée de ROS et être potentiellement toxique, même si aucune preuve expérimentale n'a été apportée. Comme il a été abordé ci-dessus, l'expression du transgène peut être sous la dépendance d'un promoteur avec une activation spécifique des cellules myéloïdes. Le promoteur humain de miRNA223, connu pour être fortement activé durant la différenciation myéloïde, a parfaitement démontré sa myélospécificité : l'expression de gp91^{phox} ou p47^{phox} apporté à des cellules CD34⁺ grâce à des vecteurs SIN rétroviraux et lentiviraux

est restreinte aux cellules phagocytaires, même si une faible expression a été détectée dans les lymphocytes ou les cellules souches/progéniteurs hématopoïétiques (212).

Pour conclure, bien que cette thérapeutique soit novatrice et prometteuse, elle reste lourde à mettre en place, coûteuse et non dénuée de risques pour le patient. Si pour l'instant aucun patient n'a été définitivement guéri grâce à la thérapie génique, elle a permis de résoudre rapidement et à long terme (quelques années) des infections graves préexistantes chez certains d'entre eux. Des améliorations sont à prévoir dans les années à venir avec comme objectif la reconstitution d'un taux de neutrophiles fonctionnels suffisant pour assurer une protection du patient, leur persistance à long terme chez celui-ci, ainsi qu'une maîtrise du risque insertionnel.

Chapitre 2 : Les cellules souches pluripotentes induites

1. Généralités sur les cellules souches chez l'Homme

1.1. Les différents types de cellules souches humaines

Chez l'Homme, il existe différents types de cellules souches qui vont apparaître pendant le développement depuis l'embryon 1 cellule jusqu'au stade adulte. Les principales cellules souches retrouvées sont indiquées dans la figure 5.

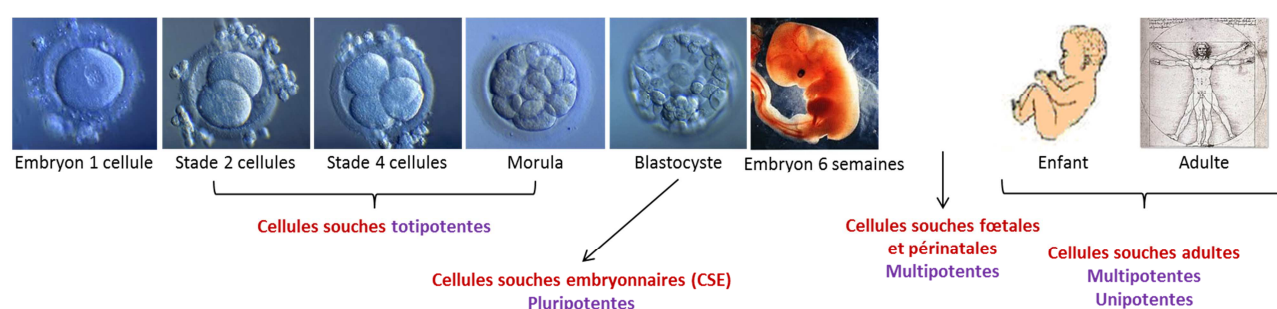


Figure 5. Les différents types de cellules souches humaines, leurs origines et leur capacité de différenciation. Les images des différentes étapes du développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste ont été prises sur le site : http://www.gfmer.ch/Livres/FIV_atlas/FIV_ICSI.htm.

Les cellules souches sont définies par deux propriétés intrinsèques : leur capacité d'auto-renouvellement et leur potentiel de différenciation ou degré de potence, c'est-à-dire leur capacité à se différencier en différents types cellulaires (Figure 6).

Toutes les cellules souches sont capables de se multiplier, en théorie à l'infini en restant à un stade indifférencié. Cette division cellulaire repose sur la réplication du matériel génétique et la formation de deux cellules souches-filles identiques. Ce mode de division, symétrique, permet de conserver un réservoir de cellules souches (Figure 6A-i). Dans certaines circonstances, il peut également se produire une différenciation et la division sera soit symétrique avec formation de deux cellules-filles plus différenciées, et donc diminution du pool de cellules souches, soit asymétrique avec formation d'une cellule souche et d'une cellule engagée dans une voie de différenciation (Figure 6A-ii et -iii).

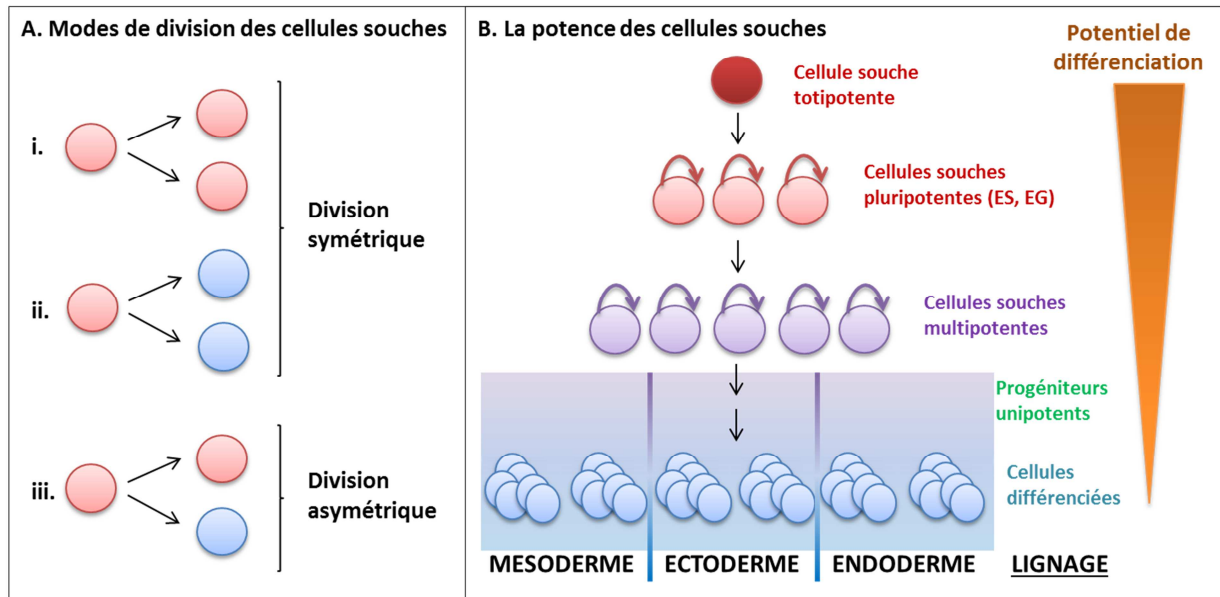


Figure 6. Modes de division (A) et potence (B) des cellules souches.

On distingue quatre degrés de potence : la totipotence, la pluripotence, la multipotence et l'unipotence. Au fur et à mesure de la différenciation, les cellules perdent leur capacité de potence (Figure 6B). La totipotence concerne uniquement les cellules issues des premières divisions de l'œuf fécondé (du stade 2 cellules au stade 8 cellules), c'est-à-dire jusqu'au 4^{ème} jour environ du développement embryonnaire (Figure 5). Ces cellules sont capables de donner naissance à des cellules des 3 feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme ou endoderme) ainsi qu'au tissu extra-embryonnaire (qui donnera les annexes embryonnaires, le cordon ombilical et le placenta) ; elles peuvent donc reformer un organisme entier. Contrairement aux cellules totipotentes, les cellules pluripotentes ne peuvent pas recréer un organisme entier. Elles pourront cependant se différencier en tous les types cellulaires de l'organisme (plus de 200, y compris les cellules germinales) dérivés de l'un des trois feuillets embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires en sont l'exemple type (Figure 5). De même, bien que pouvant donner différents types cellulaires, les cellules souches multipotentes sont déjà déterminées, engagées dans une voie de différenciation au sein d'un lignage spécifique. On peut citer notamment l'exemple des cellules souches adultes hématopoïétiques. Enfin, les cellules souches unipotentes peuvent proliférer mais en ne donnant qu'un seul type cellulaire, ce sont des progéniteurs (Figure 6B).

Trois grands types de cellules souches sont retrouvés chez l'Homme : les cellules souches embryonnaires, les cellules souches fœtales, et les cellules souches adultes (Figure 5).

Les cellules souches embryonnaires (CSE), également appelées « cellules ES », ont été isolées à partir d'embryons préimplantatoires chez la souris en 1981 (213,214) puis chez l'homme en 1998 (215). Elles sont issues de la masse cellulaire interne d'un embryon au stade blastocyste, soit 5-7 jours après fécondation chez l'Homme (Figure 5). Pluripotentes, elles peuvent donner tous les types cellulaires d'un organisme, ce qui a très vite suscité un vif intérêt dans le milieu de la Recherche aussi bien pour comprendre les mécanismes du développement embryonnaire que dans un objectif plus thérapeutique, notamment la médecine régénérative. Mais l'obtention des cellules ES nécessitant la destruction de l'embryon, les premières lois de Bioéthique en 1994 puis celles de 2004 et 2011 en ont restreint l'utilisation (dérogations accordées pour 5 ans). Depuis Juillet 2013 (vote du Parlement modifiant la loi n°2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la Bioéthique), l'interdiction d'expérimentation avec dérogation est passée à l'autorisation encadrée.

Les cellules souches fœtales sont issues du fœtus lui-même (5-7^{èmes} semaines jusqu'au dernier trimestre de gestation, résultant d'Interruptions Volontaires de Grossesse). Leur utilisation est limitée par la difficulté d'accessibilité aux tissus. Par contre, le prélèvement de sang fœtal est une option thérapeutique intéressante puisqu'il est très riche en cellules souches hématopoïétiques (CSH) (216). Les cellules souches « périnatales » sont issues des tissus extra-embryonnaires tels que le liquide amniotique, le placenta (membrane amniotique, villi et sang) et le cordon ombilical (sang et gelée de Wharton) (217). Les CSH isolées du sang de cordon ont démontré leur utilité clinique pour la transplantation allogénique (218).

Les cellules souches adultes ont d'abord été mises en évidence dans les tissus à renouvellement rapide (moelle osseuse, épithélium digestif...) puis elles ont été retrouvées dans pratiquement tous les organes (os, système nerveux, foie, intestin, peau, muscle...). Multipotentes ou unipotentes, elles sont présentes tout au long de la vie d'un individu et assurent l'homéostasie des organes ou tissus (régénération/réparation tissulaire). Cependant, leur localisation parfois difficilement accessible (cœur, cerveau...), leur quantité très limitée et la difficulté de les identifier (pas de marqueurs spécifiques) limitent leur utilisation thérapeutique. Seules les CSH du sang ou de la moelle osseuse sont actuellement couramment utilisées en clinique pour la transplantation (autologue ou allogénique).

Les cellules souches humaines possèdent une portée thérapeutique considérable mais leur utilisation est limitée soit pour des raisons éthiques, immunologiques, oncologiques soit par la quantité de matériel disponible.

1.2. La reprogrammation nucléaire en cellules souches pluripotentes

La reprogrammation nucléaire, processus par lequel l'état de différenciation d'une cellule spécialisée peut être changé en un autre état, constitue un énorme challenge depuis de nombreuses années, et notamment la transformation de cellules différenciées en cellules souches pluripotentes. Cette reprogrammation nécessite notamment la réinitialisation des mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications d'histones...) contrôlant l'expression des gènes spécifiques d'un lignage donné. L'état différencié des cellules somatiques a longtemps été considéré comme stable et surtout irréversible : les cellules souches se différencient progressivement dans un lignage et il est difficile de convertir des cellules d'un type cellulaire en un autre du même lignage et encore plus dans un lignage différent (Conrad Waddington, 1957). Mais différentes avancées technologiques sont venues bouleverser ces à priori en montrant l'étonnante plasticité des cellules et ont permis, au-delà de leur intérêt dans la compréhension des mécanismes de la biologie cellulaire, d'apporter de nouveaux espoirs pour la recherche médicale.

Deux approches majeures, le transfert nucléaire et la fusion cellulaire, ont été développées pour reprogrammer des cellules somatiques différenciées vers la pluripotence.

Le transfert nucléaire de cellules somatiques (TNCS) : Bien que les premiers travaux de transfert de noyaux de cellules embryonnaires ou somatiques dans des œufs de grenouille ont montré qu'il était possible de produire un individu adulte (219,220), ce n'est que 30 ans plus tard que le transfert nucléaire de cellules somatiques, communément appelé clonage thérapeutique, a été réalisé avec succès chez les Mammifères. Ainsi, en 1997, Wilmut *et al.* ont réussi à transférer le noyau de cellules folliculaires dans des oocytes (œufs non fertilisés) énucléés bloqués en métaphase, donnant naissance à la brebis Dolly (Figure 7) (221). Ces travaux de transfert nucléaire ont permis de mettre en évidence la présence de facteurs cytoplasmiques dans les oocytes permettant la réinitialisation du noyau de la cellule somatique transplanté à un état pluripotent voire totipotent.

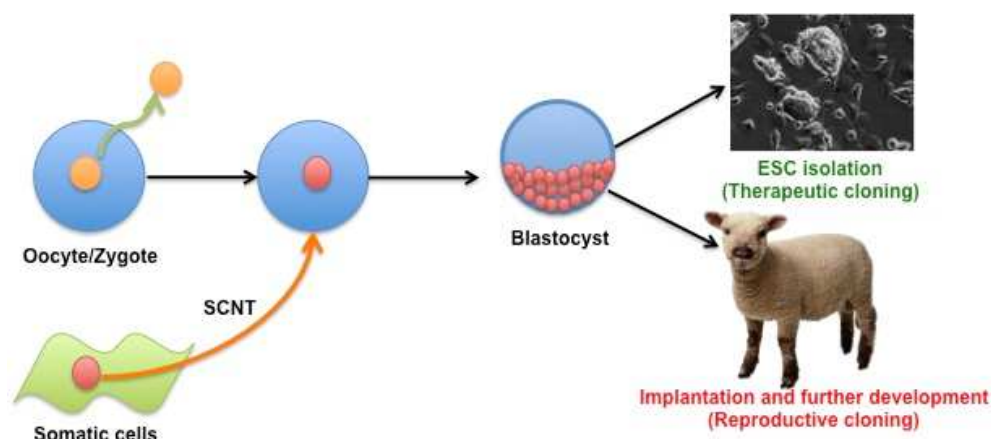


Figure 7. Le mécanisme de transfert nucléaire de cellules somatiques (TNCS). D'après (222) Lo and Verfaillie (2013).

Grâce à cette technologie dont le principe est décrit dans la Figure 7, des cellules ntESCs (cellules ES obtenues par transfert nucléaire) ont pu être produites chez différentes espèces, y compris les primates (223). Le taux de succès du clonage est fonction de la cellule originale et peut varier de 0 à 20 %. Récemment, des ntESCs humaines spécifiques de la cellule somatique donneuse ont été dérivés de blastocystes humains clonés mais uniquement lorsque le génome de l'oocyte était conservé (224). Ces lignées ntESCs humaines sont donc triploïdes mais possèdent les caractéristiques de cellules souches pluripotentes (225). Cette technologie pourrait permettre la production de cellules ES spécifiques de patient mais la triploïdie de ces cellules limite leur utilisation thérapeutique. De plus, elle se heurte toujours aux considérations éthiques liées à l'utilisation d'oocytes humains. Enfin, l'apparition d'anomalies de développement chez les souris clonées ont conduit à émettre l'hypothèse qu'il se produit une reprogrammation nucléaire incomplète avec persistance d'une « mémoire épigénétique » de la cellule donneuse (226).

La fusion cellulaire de deux types cellulaires (ou plus) : des cellules somatiques ont d'abord été reprogrammées à un état pluripotent par fusion avec des cellules embryonnaires de carcinome (227) puis avec des cellules ES murines (228) ou humaines (229). Les cellules fusionnées conduisent soit à la formation d'une cellule « hybride » (en cas de division cellulaire et de réplication de l'ADN), soit à un hétérocaryon (une cellule à plusieurs noyaux qui se forme en l'absence de division et de réplication, à très courte durée de vie) (Figure 8). Ces cellules « hybrides » sont capables de se différencier *in vitro* et *in vivo*, et l'analyse du génome de la cellule somatique montre la réactivation de gènes de pluripotence comme *OCT4*, associée à des modifications épigénétiques, preuves de la reprogrammation à un état pluripotent (229). Cette technologie est intéressante puisque la reprogrammation des cellules somatiques peut se faire à l'aide de lignées déjà établies de cellules ES

et donc sans la destruction de nouveaux oocytes humains. Cependant, les cellules hybrides formées sont tétraploïdes et la persistance des chromosomes de la cellule ES provoque un rejet lors de la transplantation.

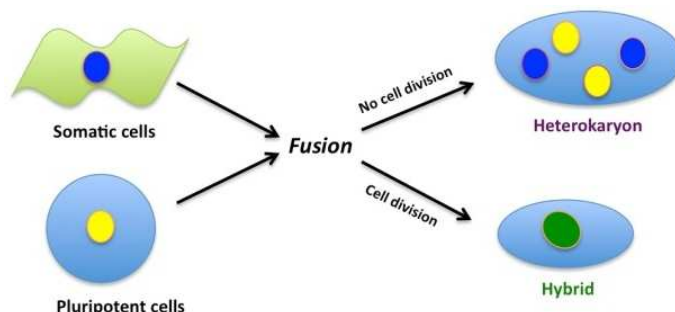


Figure 8. Principe de la fusion cellulaire de cellules somatiques avec des cellules pluripotentes conduisant à la génération soit d'une cellule hybride, soit d'un hétérocaryon. D'après (222) Lo and Verfaillie (2013).

Bien que non détaillées ici, il existe d'autres techniques de reprogrammation comme la reprogrammation spontanée par culture à long terme de certains types cellulaires (230), la parthénogénèse (231) ou le traitement des cellules somatiques par des extraits protéiques préparés à partir des cellules pluripotentes (232).

2. La "création" des cellules iPS

2.1. Historique des cellules iPS

Le développement des techniques de reprogrammation nucléaire ont permis aux chercheurs d'élucider les mécanismes moléculaires intervenant dans cette reprogrammation afin de comprendre le rôle prépondérant de certains gènes dans l'induction et le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires.

En 2006, Takahashi et Yamanaka révolutionnent ce champ en montrant que la surexpression de 4 facteurs de transcription dans des fibroblastes embryonnaires de souris permettait de les transformer en cellules souches possédant les caractéristiques des cellules ES. Elles ont ainsi été nommées cellules souches pluripotentes induites (iPSCs, *induced Pluripotent Stem Cells*). Les facteurs Oct3/4 (ou Pou5f1), Sox2, Klf4 et c-Myc ont été sélectionnés parmi 24 gènes candidats choisis pour leur implication dans la pluripotence et/ou la maintenance des cellules souches embryonnaires (233). Un an plus tard, des fibroblastes humains ont été reprogrammés en cellules iPS avec la même combinaison par cette équipe (234). En parallèle, l'équipe américaine de J. Thomson a reprogrammé

des fibroblastes humains en utilisant une combinaison alternative constituée des facteurs de transcription Oct4, Sox2, Nanog et Lin28 clonés dans un vecteur lentiviral (235).

La technique développée par l'équipe de S. Yamanaka est la suivante. Des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) *Fbx15*^{geo/geo} ont été modifiés par l'insertion d'une cassette *βgeo* (= fusion du gène de la *β*-galactosidase et du gène de résistance à la néomycine) dans le gène *Fbx15* permettant la sélection de cellules reprogrammées à un état pluripotent, celui-ci étant actif uniquement dans les cellules ES. L'ADNc des 24 gènes candidats a été introduit dans ces MEFs par transduction rétrovirale, et ils ont pu alors sélectionner la combinaison de 4 facteurs indispensables pour induire la pluripotence (Figure 9). Cependant, ces cellules iPS n'étaient pas entièrement reprogrammées puisqu'elles ne pouvaient générer de souris adultes chimériques, contrairement aux cellules ES.

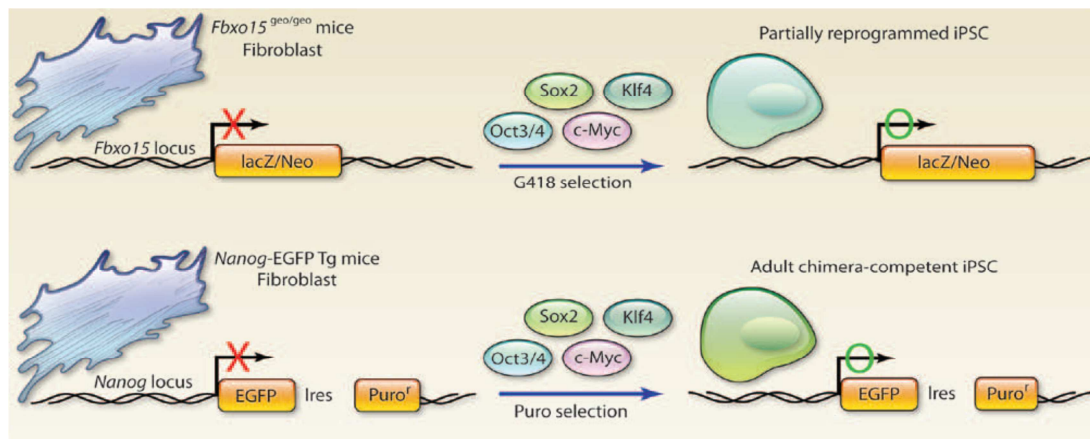


Figure 9. Evolution des méthodes de génération des cellules iPS murines. D'après (236) Okano *et al.*, *Nat. Cell. Biol.* (2013).

Plus tard, l'utilisation du gène *NANOG* et non plus *Fbx15* pour la sélection des cellules reprogrammées a permis la production de cellules iPS murines qui, lorsque transplantées dans un blastocyste, donnent naissance à des embryons chimériques mais également à des chimères adultes et des chimères germinales (Figure 9). Cette fois-ci, le gène *NANOG* a été modifié par insertion d'une cassette *EGFP* (*enhanced green fluorescent protein*), et les souris produites après injection dans un blastocyste étaient donc fluorescentes vertes (237,238). La génération de cellules iPS par cette technique de sélection les rend également plus proches des cellules ES en termes d'expression globale des gènes, méthylations d'ADN et modifications d'histones (237–239). Puis d'autres équipes ont montré qu'aucune sélection autre que par la morphologie ou l'expression de marqueurs de pluripotence comme Tra-1-81 n'était nécessaire pour isoler les clones iPS reprogrammés (240,241).

2.2. Le processus de reprogrammation

La reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes ES-like requiert l'élimination des marques épigénétiques propres aux cellules somatiques et l'établissement de nouvelles marques caractéristiques de la pluripotence. La mise en place de cet état met en jeu un réseau très complexe de régulation des mécanismes intervenant dans la pluripotence (Figure 10). Le rôle des différents facteurs de transcription les plus utilisés, ainsi que le processus global de la reprogrammation sont détaillés ci-dessous.

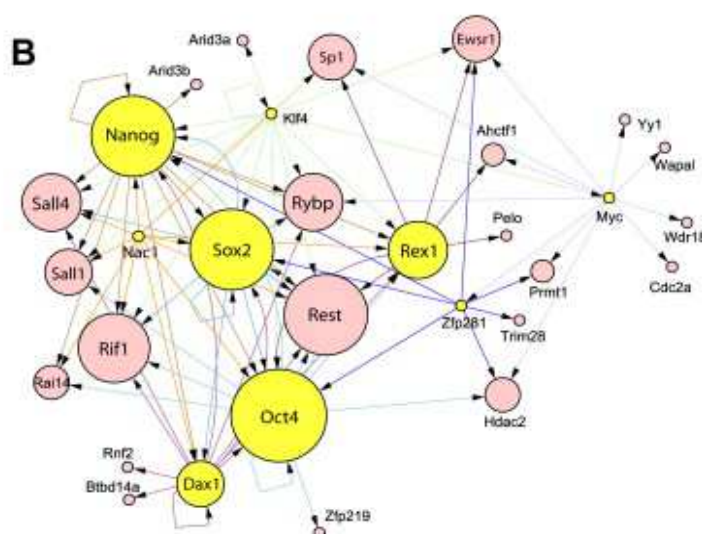


Figure 10. Le réseau de la pluripotence dans les cellules ES. D'après (242) Kim *et al.*, *Cell* (2008).

2.2.1. Les facteurs de transcription Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog et Lin28

Les facteurs de transcription Oct3/4, Sox2 et Nanog sont exprimés dans les cellules souches ES et permettent le maintien de la pluripotence et l'auto-renouvellement (243–245). c-Myc est l'oncogène le plus fréquemment dérégulé dans les cancers humains, il contrôle l'expression de centaines de gènes cibles dont beaucoup sont également des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs. Il est également impliqué dans la prolifération cellulaire et le cycle cellulaire. En s'associant avec des complexes histone acétyltransférase (HAT), il induirait une acétylation globale des histones, permettant alors à Oct3/4 et Sox2 de se lier à des sites inaccessibles autrement (246). Oct3/4 et Sox2 sont donc indispensables pour la reprogrammation en cellules iPS en induisant l'activation du réseau de la pluripotence. Ils vont notamment activer le gène *NANOG*, celui-ci n'est pas nécessaire lors des premières étapes mais augmenterait la survie des cellules reprogrammées (235). Par contre, dans les cellules ES, l'expression forcée de c-Myc induit la différenciation et l'apoptose à cause de l'activation de la voie p53/p21 (247). Il agirait donc plutôt comme un

« booster » de la reprogrammation plutôt que dans la maintenance de la pluripotence des cellules iPS. Klf4 est un facteur de transcription impliqué dans la prolifération cellulaire, la différenciation et la survie. Il peut fonctionner à la fois comme un gène suppresseur de tumeur mais également comme un oncogène. Il réprime directement la protéine p53 (248) qui est connue pour supprimer l'expression de Nanog lors de la différenciation des cellules ES (249). De plus, il co-occupe avec Oct3/4 le promoteur de *NANOG* (250). Klf4 contribue donc à l'activation de *NANOG* ainsi que d'autres gènes spécifiques. La balance entre c-Myc et Klf4 est cruciale pour une reprogrammation efficace puisque Klf4 inhibe l'apoptose induite par c-Myc. Le facteur de transcription Lin28 induit un effet relativement modeste. Il agit comme un oncogène puisque sa surexpression conduit à l'augmentation de la division cellulaire, ce qui entraîne l'accélération de la cinétique de génération des cellules iPS (251).

2.2.2. Le processus séquentiel de la reprogrammation

Les différentes étapes du processus de reprogrammation sont récapitulées dans la Figure 11.

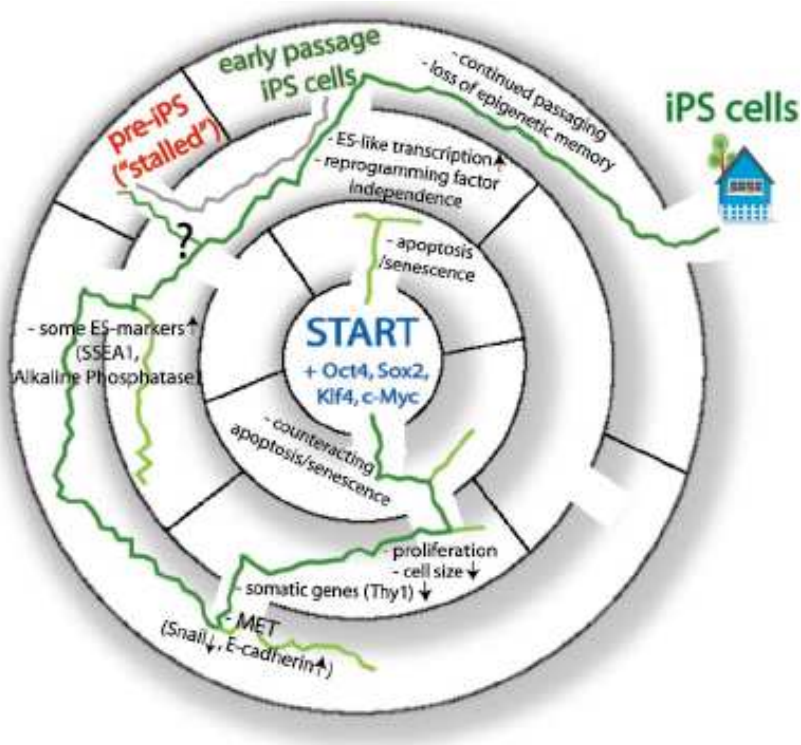


Figure 11. Le « labyrinthe » de la pluripotence lors de la reprogrammation en cellules iPS. Il représente les changements morphologiques et transcriptionnels lors de la reprogrammation jusqu'à l'état de cellules iPS. La ligne vert foncé conduit à la génération de cellules iPS parfaitement reprogrammées alors que les lignes vert clair montrent l'échec du processus de reprogrammation. La ligne grise indique que les cellules « pré-iPS » se trouvant dans un état intermédiaire de reprogrammation, peuvent être complètement reprogrammées grâce à divers traitements. D'après (252) Papp and Plath, *Cell Research* (2011).

Sous l'influence des facteurs de reprogrammation, les cellules somatiques vont subir une transition mésenchymale-épithéliale (MET), l'un des événements les plus précoces (253). L'acquisition de propriétés épithéliales va s'accompagner de modifications métaboliques, d'un changement de la morphologie des cellules, d'un échappement à l'arrêt du cycle cellulaire (apoptose/sénescence) et d'une prolifération plus rapide (Figure 12) (254). Cette accélération du cycle cellulaire faciliterait la reprogrammation en permettant les modifications de la chromatine lors de la réplication de l'ADN (255). La réactivation de la télomérase lors de la reprogrammation permet aux cellules de se diviser à l'infini sans raccourcissement de leurs télomères (256).

Puis certains gènes de pluripotence comme *NANOG* seraient rapidement activés après la MET (257). Les protéines qu'ils codent participeraient à la mise en place du circuit de pluripotence et l'activation hiérarchique des autres gènes de pluripotence.

Plus tardivement au cours de la génération des cellules iPS, et après activation du circuit de pluripotence, les cellules reprogrammées sont capables de s'auto-renouveler indépendamment des facteurs introduits. En effet, si l'expression des facteurs de transcription exogènes (apportés par le transgène) permet l'induction de la reprogrammation, le transgène subit ensuite un *silencing* et l'expression des facteurs de transcription devient alors uniquement endogène (234). Cette indépendance constitue un marqueur de l'obtention de cellules iPS complètement reprogrammées.

De nombreuses études sont encore actuellement en cours pour comprendre le rôle des différents facteurs de transcription ainsi que les mécanismes intervenant dans l'établissement de la pluripotence lors de la génération des cellules iPS.

3. Vers l'amélioration des protocoles de reprogrammation

Bien que la reprogrammation paraisse simple sur le principe, c'est un processus lent qui nécessite au minimum 2-3 semaines et dont l'efficacité, la reproductibilité et la qualité des cellules iPS produites (pluripotence et capacité de différenciation) sont influencées par différents paramètres : le choix des cellules cibles, des facteurs de reprogrammation, de la méthode de vectorisation, des conditions de culture cellulaire pour la reprogrammation... (Figure 12). Le protocole approprié doit également être déterminé en fonction de l'application prévue.

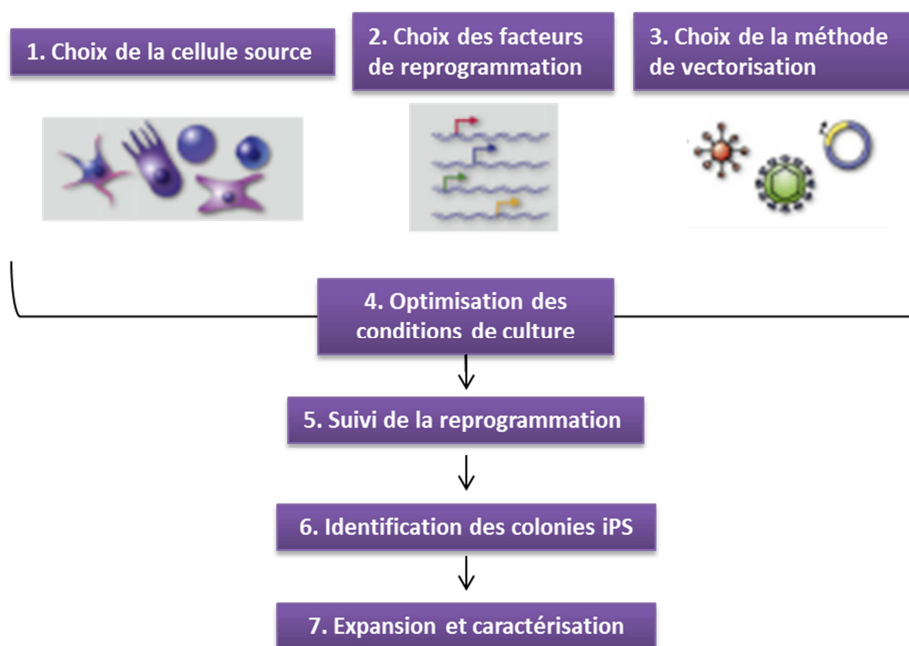


Figure 12. Vue d'ensemble du processus de reprogrammation et des différents paramètres à déterminer pour l'obtention d'une lignée de cellules iPS.

3.1. Choix de la cellule source

Les premières cellules reprogrammées étaient les fibroblastes murins et humains. Leur très large utilisation s'explique par leur facilité d'obtention (biopsie de peau), d'amplification en culture et de reprogrammation en cellules iPS (258). Depuis, d'autres types cellulaires murins ou humains ont été reprogrammés avec succès : les kératinocytes issus de cheveux (263), les cellules de cornée (260), du foie ou de l'estomac (261), les cellules progénitrices neurales (262,263), les cellules sanguines dont les lymphocytes B (264), les cellules souches adipeuses (265), les cellules souches de sang ou de matrice de cordon ombilical (266,267), et même la pulpe dentaire de dent de lait (268). Théoriquement, la surexpression des facteurs de reprogrammation est capable d'induire la génération de cellules iPS à partir de tous les types cellulaires.

Il existe cependant une très forte influence du type cellulaire de départ sur la reprogrammabilité (Figure 13). Par exemple, les kératinocytes humains sont plus rapidement et plus efficacement reprogrammés que les fibroblastes humains (259). De même, l'efficacité de reprogrammation varie en fonction du stade de différenciation de la cellule source, les progéniteurs hématopoïétiques sont ainsi une source très intéressante avec une efficacité de reprogrammation 300 fois supérieure à des cellules T ou B (269). L'augmentation de l'efficacité de reprogrammation et/ou la diminution du nombre de facteurs requis peut être attribuée à l'expression élevée endogène

de certains facteurs de reprogrammation et/ou aux statuts épigénétiques intrinsèques qui les rendent plus facilement reprogrammables.

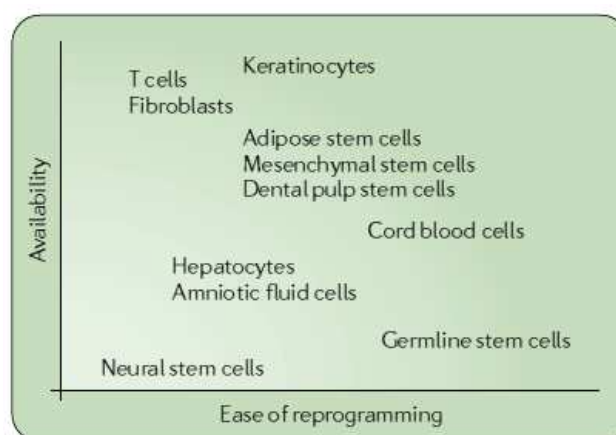


Figure 13. Influence du type cellulaire de départ sur la reprogrammabilité en cellules iPS, en fonction de sa disponibilité/accessibilité. D'après (258) González *et al.*, *Nat. Rev. Genet.* (2011).

Il est également nécessaire de prendre en compte l'âge des cellules (l'âge du donneur aussi bien que le nombre de passages en culture). En effet, les cellules plus âgées peuvent porter des lésions génétiques potentiellement délétères pour une application clinique. De même, certains organes tels que la peau sont plus exposés et susceptibles d'accumuler des mutations (270).

De plus, les profils transcriptionnel, épigénétique et fonctionnel des cellules iPS obtenues à partir de différents types cellulaires peuvent influencer leur « qualité » (271). En effet, selon la cellule d'origine, certaines cellules iPS possèdent des capacités de différenciation restreintes ou peuvent avoir une tendance plus élevée à former des tératomes (272). Cette différence de comportement est reliée à la « mémoire épigénétique », c'est-à-dire que les cellules iPS conservent des signatures épigénétiques caractéristiques de la cellule dont elles sont issues.

Enfin, il a récemment été montré que les cellules iPS ainsi que les cellules différenciées qui en dérivent conservent le même degré d'immunogénicité (expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité) que leurs cellules sources (273).

En conclusion, le choix du type de cellule source dépend de nombreux critères mais toujours en tenant compte de l'objectif visé. Pour un usage thérapeutique, il est préférable que celles-ci soient facilement accessibles (sans geste invasif) et disponibles en grande quantité, mais en contenant le moins d'aberrations génétiques possible, le moins immunogéniques possible, faciles à reprogrammer et avec une bonne efficacité/rapidité.

3.2. Le cocktail de reprogrammation

3.2.1. Les facteurs de transcription

Le cocktail de facteurs de transcription largement utilisé est celui de l'équipe de S. Yamanaka (OSKM : Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc, également appelé « cocktail Yamanaka »). Mais l'utilisation de c-Myc est problématique : environ 20 % des souris chimères dérivées de cellules iPS ont développé des tumeurs, attribuable à la réactivation de l'expression rétrovirale de c-Myc (237). Il est possible de reprogrammer des fibroblastes murins et humains sans c-Myc mais l'efficacité de reprogrammation est significativement réduite et le délai de reprogrammation rallongé (274,275). Différents cocktails de reprogrammation comme celui développé par l'équipe de J. Thomson (OSNL : Oct3/4, Sox2, Nanog et Lin28) permettent également de générer des cellules iPS avec une efficacité comparable au « cocktail Yamanaka » (235).

Comme déjà abordé précédemment, certains types cellulaires sont plus facilement reprogrammables, et des cellules iPS ont pu être produites à partir de cellules CD133+ issues de sang de cordon en utilisant uniquement les facteurs de reprogrammation Oct4 et Sox2 (267). Dans certains cas, cela peut s'expliquer par l'existence d'une expression endogène de facteurs de reprogrammation, ce qui permet de retirer ceux-ci des cocktails utilisés. Les cellules progénitrices neurales murines, exprimant Sox2 et c-Myc à des niveaux supérieurs aux cellules ES, ont été reprogrammées avec succès en utilisant seulement Oct4 et Klf4 ou Oct4 et c-Myc bien qu'avec une efficacité plus faible qu'avec 4 facteurs (262,276).

A l'inverse, Hanna *et al.* ont montré que la surexpression de Lin28 associé à l'utilisation d'un cocktail OSKM accélérerait la reprogrammation (251). De même, un protocole utilisant 6 facteurs de transcription (OSKMNL) augmenterait l'efficacité de reprogrammation de 10 fois par rapport à un protocole avec 4 facteurs (277). Grâce à ce cocktail OSKMNL, l'équipe de JM. Lemaître a reprogrammé avec succès des cellules sénescents, ouvrant ainsi une porte vers la lutte contre le vieillissement (278). L'association d'autres facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence peuvent être ajoutés comme UTF1 (279) ou Sall4 (280).

La durée optimale d'exposition aux facteurs de reprogrammation est dépendante du type cellulaire d'origine ainsi que de la technique de délivrance employée, et doit donc être adaptée : la reprogrammation de MEFs par une technique rétrovirale nécessite 8-12 jours d'exposition aux facteurs de reprogrammation alors que les fibroblastes humains requièrent environ 20-25 jours avec la même technique et les kératinocytes humains 10 jours (281). Une exposition prolongée peut avoir

des effets délétères et l'exposition aux facteurs doit donc être stoppée dès l'apparition de l'état de pluripotence (282).

Le niveau d'expression de chacun des facteurs utilisés ainsi que la stœchiométrie entre ceux-ci sont d'importants critères pour une bonne induction de la reprogrammation. L'augmentation des transgènes Oct3/4 dans le cocktail de reprogrammation augmente l'induction en cellules iPS alors que l'augmentation des 3 autres facteurs Sox2, Klf4 et c-Myc la diminue (283). Pourtant, l'expression excessive d'Oct3/4 conduit à la suppression de la reprogrammation. Il existerait donc une proportion optimale d'expression des différents facteurs mais les mécanismes régulant cette reprogrammation restent très difficiles à maîtriser.

Certains microARN (ou miRNA, des ARN non codants de 21-23 nucléotides) dont le cluster miR302/367, ont montré leur intérêt pour améliorer la génération des cellules iPS en association avec des facteurs de transcription (OSK) (284,285) ou avec seulement de l'acide valproïque (286).

3.2.2. Les petites molécules

Bien que le cocktail OSKM représente le protocole standard pour la reprogrammation, des petites molécules se sont révélées très utiles puisque leur addition dans le milieu de culture permet d'augmenter significativement l'efficacité de reprogrammation, voire même de remplacer les facteurs de transcription (288,289).

Le remodelage de la chromatine est une étape limitante lors de la génération de cellules iPS. Ainsi, les molécules agissant sur ces mécanismes épigénétiques de remodelage de la chromatine vont améliorer significativement l'efficacité de reprogrammation. Parmi ceux-ci, les inhibiteurs des histones déacétylases (HDAC) (comme l'acide valproïque (VPA) ou la trichostatine A (TSA)), des histones déméthylase (HDM) ou des histones méthyltransférase (HMT) (290) sont très utilisés. Il est également possible d'agir sur la méthylation de l'ADN en associant des inhibiteurs d'ADN méthyltransférase (DNMT) (5-azacytidine) (282,287).

De la même façon, certaines voies de signalisation impliquant des enzymes ou des cytokines comme le TGF- β peuvent constituer des barrières empêchant la reprogrammation (291–295). De même, la voie p53/p21 (ou l'un ses activateurs, le locus Ink4/Arf) est activée lors de l'induction de la reprogrammation et induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. Le blocage de ces voies de signalisation par des molécules chimiques, des siRNA ou des shRNA, permet d'augmenter l'efficacité et même d'accélérer la cinétique de reprogrammation (296) (251,279,297,298). Cependant, même si

le blocage de la voie p53/p21 est une piste intéressante, il ne peut être systématique puisqu'il augmente la probabilité de transformation maligne et induit une instabilité génomique.

D'autres composés chimiques comme la thiazovivine, un inhibiteur de l'apoptose (299), ou même des agonistes des canaux calciques de type L (300,301) peuvent être employés. La vitamine C par exemple, en diminuant la sénescence, en induisant la déméthylation de l'ADN, et en accélérant les modifications de l'expression des gènes, promeut la transition des colonies pré-iPS vers un état complètement reprogrammé (302,303).

Ces diverses molécules et autres facteurs solubles, par leur facilité d'utilisation et l'absence de modification génétique permanente, représentent une aide précieuse pour la reprogrammation. Leur effet est souvent rapide et réversible, permettant une bonne régulation temporelle.

3.3. Les vecteurs utilisés

Différents vecteurs ont été développés pour délivrer les facteurs de reprogrammation jusqu'aux cellules somatiques. Les principales stratégies sont décrites dans la Figure 14.

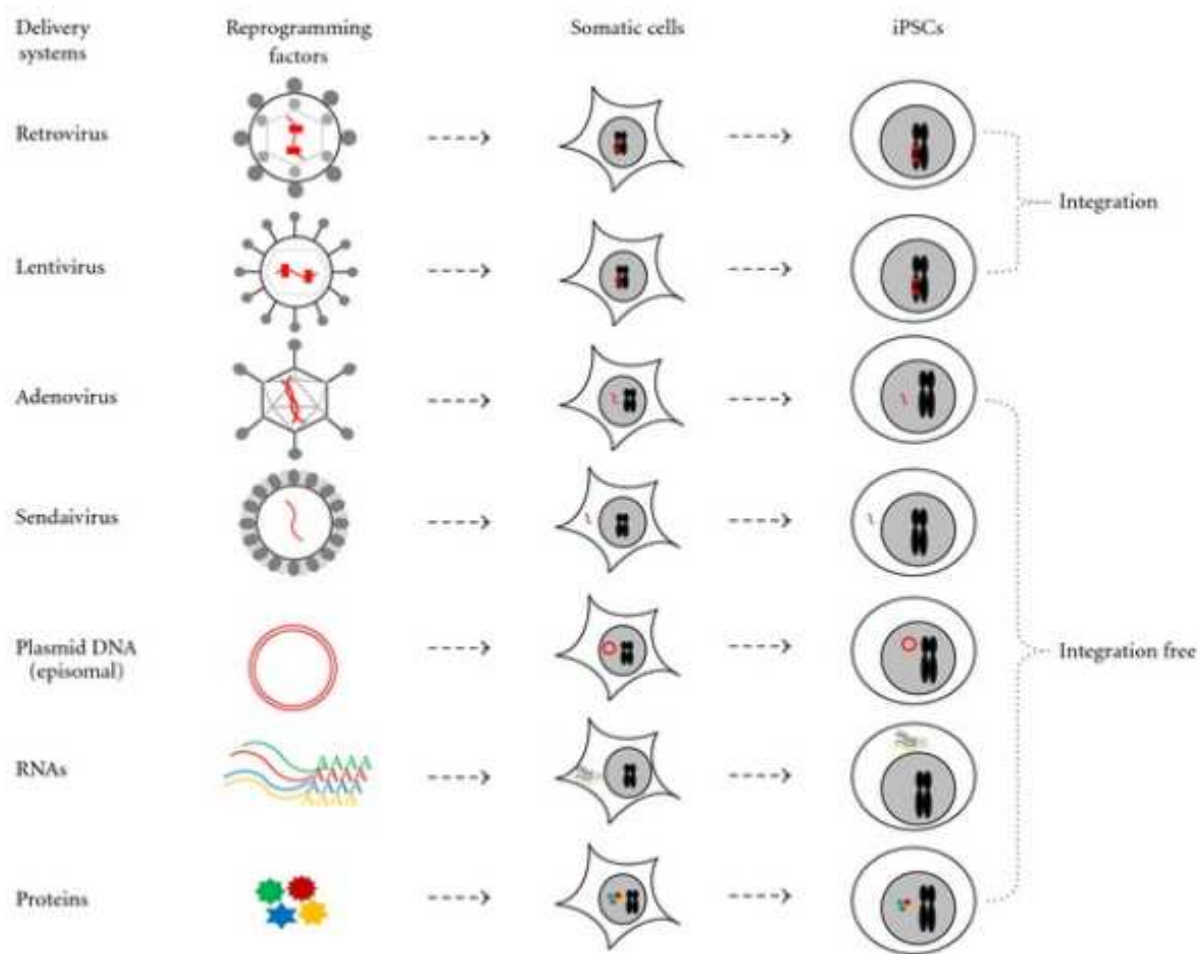


Figure 14. Les stratégies de reprogrammation des cellules somatiques en cellules iPS par différentes méthodes de délivrance des facteurs de reprogrammation. D'après (304) Oh et al., *The Scientific World Journal* (2012).

L'efficacité de reprogrammation ainsi que les avantages/inconvénients de chaque stratégie sont récapitulés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2). Nous aborderons tout d'abord les méthodes virales (intégratives et non intégratives) puis les méthodes non virales.

Tableau 2. Tableau récapitulatif des principales méthodes de reprogrammation. D'après (305) Antony-Debré *et al.*, *Hématologie* (2013).

Type de vecteur	INTÉGRATION				SANS INTÉGRATION					
	Vecteurs intégratifs		Vecteurs excisables		Vecteurs non intégratifs			Méthodes sans vecteurs		
	Rétrovirus	Lentivirus	Lentivirus floxé	Transposon	Adénovirus	Plasmides	Virus Sendai	Protéines	ARNm	miRNA
Efficacité de reprogrammation	0,01-0,5%	0,1-1%	0,1-1%	0,1%	0,001%	0,001%	0,02-1%	0,001%	1%	0,01-0,5%
Avantages	Efficacité	Efficacité	Efficacité, pas d'intégration	Efficacité raisonnable, pas d'intégration	Pas d'intégration	Pas d'intégration	Efficacité, pas d'intégration	Pas d'intégration, pas d'ADN	Pas d'intégration, efficacité	Pas d'intégration
Inconvénients	Intégrations multiples, réactivation des transgènes	Intégrations multiples, réactivation des transgènes	Obtention des lignées laborieuse	Obtention des lignées laborieuse	Faible efficacité	Faible efficacité, intégration occasionnelle	Efficacité moyenne sur les cellules matures	Faible efficacité	Plusieurs transfections nécessaires	Plusieurs transfections nécessaires

3.3.1. Les méthodes virales

▪ Les vecteurs viraux intégratifs

Les premières générations de cellules iPS ont été obtenues grâce aux systèmes de vectorisation intégratifs viraux permettant de délivrer du matériel génétique à une cellule cible avec une haute efficacité, et d'induire l'expression à long terme du transgène. Mais l'utilisation de ces systèmes viraux, parmi lesquels on peut citer les rétrovirus et les lentivirus, reste controversée à cause des multiples copies pouvant s'intégrer dans le génome et causer la réactivation d'oncogènes silencieux tels que Klf4 et c-Myc, ou induire des altérations génétiques augmentant le risque de transformation cancéreuse. En outre, cette intégration aléatoire peut entraîner le *silencing* ou la fusion avec des gènes endogènes, voire même bloquer la différenciation vers certains lignages.

- **Rétrovirus** : les rétrovirus de type MMLV (*murine Maloney Leukemia virus*) utilisés pour produire les premières iPS ont une assez bonne efficacité de transduction dans les cellules cibles (> 90 %) sans effets délétères sur la viabilité cellulaire. Ils s'intègrent uniquement dans le génome de cellules en division (Figure 14). Les sites et le nombre d'insertions dans le génome ne sont pas maîtrisés : les clones iPS générés peuvent contenir de 3 et 6 intégrations pour chaque facteur, augmentant le nombre total de sites d'intégration à plus de 20 par clone (234,238). En 2011, Zhang *et al.* ont développé un vecteur rétroviral polycistronique codant pour les 4 facteurs OSKM qui, associé à l'utilisation de petites molécules chimiques, a permis la reprogrammation complète en cellules iPS plus rapidement, avec une grande efficacité et une seule copie du vecteur intégrée (306).

- **Lentivirus** : ils sont généralement dérivés du virus HIV et possèdent une plus grande efficacité de transfection que les rétrovirus MMLV. De plus, ils s'intègrent dans le génome de cellules en division ou quiescentes, et peuvent donc être utilisés sur une plus large variété de types cellulaires (Figure 14). Ils ont permis de reprogrammer différents types de cellules somatiques avec une efficacité comparable à celle des rétrovirus (Tableau 2) (235,307). Des systèmes de vecteur lentiviral inducible utilisant la doxycycline comme activateur ont été utilisés pour contrôler spécifiquement l'expression des 4 facteurs de transcription et sélectionner uniquement les cellules complètement reprogrammées (256). Wernig *et al.* ont amélioré cette technique pour obtenir des cellules iPS murines ou humaines plus homogènes en maîtrisant le nombre et la localisation des insertions virales (281,308,309). Comme dans la technique rétrovirale, l'utilisation d'un vecteur lentiviral polycistronique inducible contenant les facteurs OSKM permet une seule intégration du transgène (310,311). L'évolution majeure des techniques lentivirales repose sur le développement de stratégies d'excision pour retirer les transgènes de leurs sites d'intégration. Ces stratégies peuvent faire appel au système de recombinaison *Cre-loxP* (312–314). Cependant, ce protocole d'excision peut laisser des séquences loxP et des fragments d'ADN du vecteur, pouvant résulter en une instabilité et des réarrangements génomiques. Une stratégie alternative repose sur le système transposon/transposase *piggyBac*, capable de s'intégrer dans le génome puis, avec la ré-expression de la transposase, de se retirer lui-même des cellules iPS obtenues, mais en laissant parfois des microdélétions au point d'excision du transposon. Plusieurs transposons ou un transposon unique codant pour les 5 facteurs de reprogrammation OSKML ont permis la reprogrammation de MEFs ou de cellules humaines avec une efficacité équivalente aux techniques rétrovirales (312,315,316). Cependant, ces approches d'excision restent complexes à mettre en œuvre et nécessitent du temps pour sélectionner les cellules iPS.

▪ **Les vecteurs viraux non intégratifs**

- **Adénovirus** : ce sont des virus à ADN double brin non intégratifs. Après transduction dans des cellules en division ou non, ils restent sous forme épichromosomique. L'utilisation d'adénovirus a permis la génération de cellules iPS murines (317) et humaines (318), mais avec une efficacité 10 fois plus faible que les méthodes rétrovirales (environ 0,001 %) (Tableau 2). Du fait de l'absence d'intégration, l'expression du transgène est seulement transitoire et cette méthode de reprogrammation requiert donc des transfections répétées.
- **Virus Sendai** : virus à ARN non intégratif, le virus Sendai réplique son génome exclusivement dans le cytoplasme de la cellule transfectée, en division ou non (319). Il a permis de générer

efficacement des cellules iPS humaines à partir de fibroblastes (0,02-1 %) (320). Ce premier essai a démontré que l'expression du virus diminue progressivement au cours des cultures, et que, pour les cellules iPS ayant conservé le génome viral, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine HN (protéine majeure exprimée à la surface des cellules infectées), permettait de sélectionner négativement des cellules iPS « *virus-free* ». Un mutant du virus Sendai, sensible à la température, représente également une alternative efficace pour éliminer totalement le virus des cellules iPS reprogrammées à partir de cellules de sanguines (321) et de cellules de sang de cordon CD34+ (322).

3.3.2. Les méthodes non virales

▪ Basées sur l'ADN

- **Plasmides non épisomal** : ces vecteurs plasmidiques ne s'intègrent généralement pas dans le génome, et sont exprimés 2-3 jours après la transfection, uniquement de façon transitoire, ce qui nécessite des transfections répétées. Plusieurs groupes ont montré que la transfection de plusieurs plasmides (323,324), ou d'un seul plasmide polycistronique (325) dans des MEFS permettait d'obtenir des cellules iPS murines. Des cellules iPS humaines ont aussi pu être générées par une technique simple consistant en deux transfections de 4 plasmides codant les facteurs OSNL (326). Cependant, bien que moins coûteux et globalement plus sûrs, les plasmides ont une plus faible efficacité de transduction et de reprogrammation (0,001 %) que les vecteurs viraux intégratifs (Tableau 2).
- **Vecteur plasmidique épisomal** : cet élément extra-chromosomique est localisé dans le noyau de la cellule cible. Il se réplique une seule fois par cycle cellulaire et, sous l'influence de sélection, il peut être maintenu à long terme sous forme épisomale dans près de 1 % des cellules initiales transfectées. Il ne nécessite donc pas de transfections répétées. Yu *et al.* ont montré que des cellules iPS humaines peuvent être produites avec une seule nucléofection de 3 plasmides oriP/EBNA1 (dérivé du virus EBV) codant les facteurs OSKMNL et la protéine SV40LT (*SV40 large antigen*) possédant un effet positif sur la prolifération cellulaire (327). L'efficacité de reprogrammation est très faible (0,001 %) (Tableau 2) mais il est possible d'associer des petites molécules pour l'améliorer. Cette même équipe a montré que l'utilisation de cellules mononucléées issues de la moelle osseuse ou du sang de cordon permettait d'augmenter l'efficacité de reprogrammation de 100 fois par rapport à des fibroblastes (328). Cette technique présente cependant quelques inconvénients : SV40LT est un oncogène capable d'inactiver la voie p53 et donc de produire des cellules iPS avec un fort potentiel tumorigène, et l'expression de la

protéine EBNA1 peut augmenter la reconnaissance immunitaire cellulaire des cellules transfectées (329). Leur avantage est que, en l'absence de sélection, le plasmide épisomal est progressivement éliminé des cellules iPS reprogrammées (en 7 passages environ).

- **Vecteurs ADN « minicircle »** : d'origine plasmidique ces vecteurs sont des molécules d'ADN super enroulées mais dénuées de fond bactérien (origine de réplication, gènes de résistance...). Leur petite taille permet une meilleure efficacité de transfection par rapport aux autres plasmides (mais plus faible que les techniques virales), avec une plus longue expression ectopique (plusieurs semaines). Jia *et al.* ont généré des cellules iPS en 14-16 jours à partir de cellules souches adipocytaires humaines grâce à la nucléofection d'un seul vecteur ADN « minicircle » contenant les séquences codant pour les 4 facteurs OSNL (330,331).
- **Autres méthodes** : plus anecdotiques, d'autres méthodes non intégratives ont été mises en œuvre pour produire des cellules iPS. En utilisant un bactériophage, l'intégration des ADNc se fait grâce à l'intégrase du phage en une seule copie par cellule et le plus souvent au niveau des régions intergéniques, ce qui diminue le risque d'affecter les fonctions de gènes endogènes (332). Une autre technique utilise un chromosome artificiel humain (HAC) qui présente l'avantage de se répliquer de façon autonome au cours de la division cellulaire et de permettre le transfert de multiples transgènes de taille illimitée. Des cellules iPS murines ont été générées grâce à des HAC créés à partir du chromosome 21 humain et portant les ADNc des 4 facteurs OSKM. Un shRNA p53 et un gène suicide ont également été incorporés pour améliorer l'efficacité de reprogrammation et éliminer les cellules (iPS ou cellules différenciées) qui donneraient naissance à des tumeurs (333).

- **Basées sur l'ARNm**

L'administration répétée journalière d'ARNm synthétiques s'est révélée très efficace (1-2 %) (Tableau 2) et avec une cinétique de reprogrammation supérieure (en 17 jours) aux protocoles utilisant des virus. Cependant, les ARNm déclenchent une réponse immunitaire antivirale médiée par l'interféron. Les cinq ARNm utilisés, codant les facteurs OSKML, ont donc été modifiés : la 5-méthylcytidine remplace la cytidine et la pseudouridine remplace l'uridine, ce qui a également l'avantage d'augmenter leur stabilité (334). Pourtant, une autre équipe a obtenu des résultats comparables en utilisant des ARNm non modifiés codant les 4 facteurs OSNL, et sans bloquer la réponse interféron par un inhibiteur soluble (335). Récemment, une seule transfection d'un ARN synthétique polycistronique « *self-replicating* » a permis l'expression des facteurs de transcription OSKM à un niveau élevé et constant (> 7 jours) permettant l'obtention de cellules iPS. Sa capacité

d'auto-réplication pendant un nombre limité de division cellulaire a permis de diminuer le nombre de transfections nécessaires. Son autre avantage est de pouvoir être sélectivement conservé ou éliminé des cellules hôtes en fonction de l'ajout ou non d'une protéine supprimant la réponse immunitaire innée IFN (336).

L'utilisation d'ARN permet d'éviter complètement le risque d'intégration génomique ou d'insertion mutagène. De plus, cette méthode de reprogrammation permet une meilleure régulation de la stœchiométrie contrairement aux variations d'expression typique des vecteurs intégratifs, et évite également le *silencing* viral. Les cellules iPS produites présentent une meilleure homogénéité et une signature moléculaire globale qui se rapproche plus de celle des cellules ES.

- **Basées sur les protéines recombinantes**

Cette stratégie repose sur l'utilisation d'un « *cell penetrating peptide* » (CPP), un vecteur de transduction pouvant se combiner à des composés chimiques ou à des protéines (facteurs de transcription notamment), et les transduire à travers la membrane cytoplasmique de la cellule à reprogrammer. Trois principaux CPP (11R, 9R et TAT) ont démontré leur capacité à générer des cellules iPS. Zhou *et al.* ont été les premiers à fusionner l'extrémité C-terminale des facteurs OSKM avec un CPP formé de 11 résidus arginine (11R) connu pour avoir une bonne efficacité de transduction. Ils ont obtenu des cellules iPS murines à partir du 30^{ème} jour de reprogrammation (337). Une méthode similaire utilisant un CPP formé de 9 résidus arginine (9R) a permis la reprogrammation de fibroblastes humains (338). Cette méthode simple de reprogrammation à l'aide de protéines recombinantes n'entraîne aucun risque de modifier génétiquement ou chimiquement le génome de la cellule cible. Si le taux de transduction est de 100 %, plusieurs cycles de traitement sont cependant nécessaires et la reprogrammation est lente et 100 à 1000 fois moins efficace que les méthodes virales intégratives (0,001 %) (Tableau 2). De plus, générer et purifier la quantité de protéines requise reste laborieux. Le 3^{ème} CPP récemment employé, le HIV-TAT (*human immunodeficiency virus transactivator protein*) a été fusionné avec les facteurs de transcription OSKMN et des cellules (humaines/murines) pré-traitées avec du VPA ont été reprogrammées. Cette technique a permis d'augmenter l'efficacité de transduction à 0,01 % (versus 0,001 % pour les CPP 9R et 11R) ainsi que la rapidité d'obtention de cellules iPS (13 jours) (339).

Lors de la mise en place d'une méthode de reprogrammation, il est très difficile de choisir une stratégie, d'autant plus que celle-ci doit être adaptée à l'usage souhaité des cellules iPS reprogrammées. De nombreuses avancées dans ces techniques de vectorisation ont déjà été réalisées, mais il reste à améliorer l'efficacité d'obtention des cellules iPS ainsi que la sécurité de leur

utilisation. Actuellement, les stratégies utilisant le virus Sendai et l'ARNm semblent autant voire plus efficaces, et surtout plus sûres que les techniques virales intégratives.

3.4. Les autres paramètres influençant la reprogrammation

L'efficacité de reprogrammation peut également être modifiée en fonction des conditions de culture, des cellules nourricières, de la composition du milieu... (340). Par exemple, il a été montré qu'effectuer la reprogrammation en condition hypoxique sous 5 % d'O₂ et non sous 21 % O₂ atmosphérique améliore l'efficacité de reprogrammation par une technique rétrovirale de cellules humaines et murines d'un facteur 4 et 40 respectivement (341). En vue d'une utilisation thérapeutique, une culture sans sérum voire même un système de culture indépendant des cellules nourricières sont également possibles (342). De plus, il est important de prendre en compte le type cellulaire d'origine puisque certains peuvent nécessiter des conditions de culture particulières (264).

La densité cellulaire doit également être optimale : l'utilisation de trop peu de cellules risque de les faire entrer en sénescence, alors qu'en excès, elles vont rapidement devenir confluentes et empêcher la croissance des colonies reprogrammées. La densité cellulaire appropriée doit donc être déterminée expérimentalement pour chaque méthode de reprogrammation (270).

La difficulté majeure du choix des conditions de culture réside donc dans l'optimisation de la reprogrammation tout en tenant compte du type cellulaire d'origine et de l'application visée.

4. Les techniques de culture des cellules souches pluripotentes

Les cellules souches sont continuellement en équilibre entre auto-renouvellement et différenciation. Le challenge majeur de la culture de cellules souches est de mimer le plus possible le microenvironnement *in vivo* de ces cellules pour permettre soit leur prolifération dans un état indifférencié, soit leur différenciation dirigée vers un type cellulaire précis. *In vitro*, les cellules cultivées sont soumises à un environnement dont les principaux paramètres sont le milieu, le support, l'atmosphère, et les interactions cellulaires. Chacun d'eux est donc impliqué dans un réseau complexe de signalisation déterminant le destin cellulaire et il est important de bien identifier ces paramètres clés et de les contrôler (343).

Les conditions de culture des cellules iPS murines et humaines ont été adaptées d'après celles utilisées pour les cellules ES. Elles sont spécifiques de l'espèce, et seules les techniques de culture des cellules souches pluripotentes humaines hPSCs (ES et iPS) seront présentées ici.

4.1.1. Milieux et supports de culture

Historiquement, les cellules ES puis iPS humaines sont cultivées sur des cellules nourricières fibroblastiques de souris et en présence de sérum (d'abord de veau fœtal puis de remplacement). Cependant, l'utilisation de ces composants d'origine animale non définis et soumis à des variabilités inter-lot peut induire des effets non reproductibles. Ainsi, la culture doit être standardisée et utiliser des supports et milieux définis et exempts de tout contaminant d'origine animale. Les cellules nourricières animales ont pu être remplacées par des cellules d'origine humaine, mais depuis quelques années, des conditions de culture sans cellules nourricières ni sérum sont disponibles. L'évolution progressive de ces techniques est résumée dans la Figure 15.

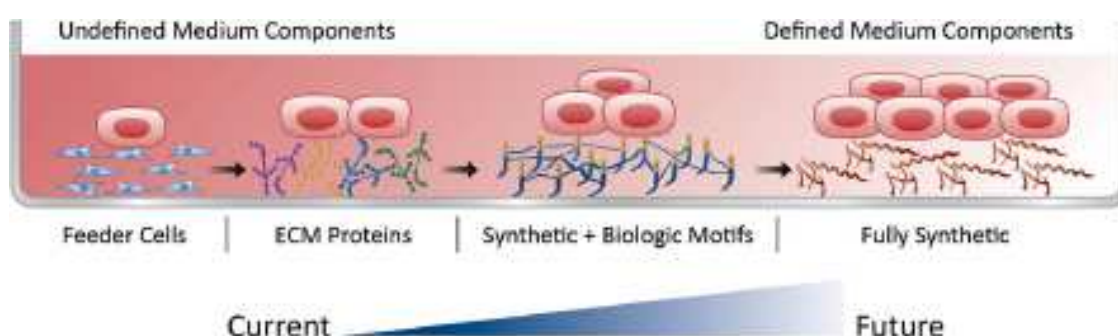


Figure 15. L'évolution des conditions de culture des cellules souches pluripotentes humaines (hPSCs). D'après (344) Villa-Diaz *et al.*, *Stem Cells* (2013).

Certains milieux de culture commerciaux (StemPro[®], mTeSR[™]...) contiennent de la sérum albumine humaine ainsi que diverses protéines matricielles d'origine humaine, ce qui les rend très chers et donc difficilement utilisables pour la production à grande échelle. Mais la composition de ces milieux évolue grâce au travail de différentes équipes. Par exemple, le milieu mTeSR[™]-E8[™] est constitué de 8 composés (incluant le DMEM/F-12), il est donc entièrement défini et moins coûteux. En outre, il permet, en association avec un support approprié, aussi bien la reprogrammation des cellules iPS que leur expansion en culture (345).

Divers facteurs de croissance ou additifs sont nécessaires pour le maintien de la pluripotence. Le bFGF est notamment le principal facteur de croissance soluble ajouté car il régule l'auto-renouvellement des cellules souches humaines pluripotentes (346). Il est intéressant de noter que c'est le LIF (*leukemia inhibitory factor*) qui est nécessaire pour la culture des cellules souches murines (347). Certains facteurs comme le composé Y-27632 et la thiazovivine, des inhibiteurs de *Rho-associated kinase* (ROCK), améliorent la survie des hPSCs lors des passages et des étapes de congélation/décongélation (348,349).

▪ Culture sur des cellules nourricières

Les hiPSCs sont classiquement induites et amplifiées sur des cellules nourricières sous forme de colonies adhérentes. Ces cellules nourricières permettent l'adhésion et la culture des hPSCs grâce à l'expression de molécules d'adhésion, la sécrétion de facteurs de croissance essentiels et diverses cytokines, ainsi que la production d'une matrice extracellulaire (MEC) composée notamment de TGFβ, activine A, laminine-511 (350) et vitronectine. Le mécanisme n'est cependant encore pas complètement élucidé.

Les cellules nourricières d'origine animale, et notamment murine, ont été les premières utilisées (Figure 16). Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs), dérivés de fœtus de souris entre 12,5 et 14,5 jours de gestation, sont les plus employés (215,235) mais leur prolifération est limitée et ils ont tendance à perdre leur capacité à supporter la culture des hPSCs au fur et à mesure des passages, ce qui nécessite de les isoler régulièrement. D'autres types cellulaires comme les cellules STO (immortalisées et facile à proliférer) (233) ou les cellules SNL (cellules STO modifiées génétiquement pour produire du LIF) (234,351) ont également été utilisés.

L'avantage principal de ces cellules nourricières animales est leur coût peu élevé associé à une facilité d'utilisation et à un bon maintien de la pluripotence des hPSCs. Par contre, elles sont une source non négligeable de pathogènes (352) et elles induisent l'expression d'Ag immunogènes tels que l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc) (353), ce qui peut entraîner un risque pour une utilisation en thérapie.

Des cellules nourricières d'origine humaine permettent de remplacer ces cellules d'origine animale. Les fibroblastes humains montrent une capacité variable à supporter la culture des hPSCs en fonction de leur origine. Ceux dérivés de tissus embryonnaires ou fœtaux (issus d'avortement) sont les plus efficaces (354,355) mais des considérations éthiques limitent leur emploi. Parmi les fibroblastes humains, les HFF (*human foreskin fibroblasts*) issus de prépuces (adultes ou nouveau-nés NuFF) sont devenus les cellules nourricières les plus utilisées (356–358). Les fibroblastes de derme (HDF) permettent aussi la dérivation et la maintenance des cellules ES (359). L'avantage de la peau est son accessibilité pour l'obtention des fibroblastes mais d'autres sources peuvent également être intéressantes. Des cellules stromales mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (HBMSCs) de donneurs ont récemment été utilisées comme cellules nourricières pour la dérivation et la maintenance des cellules iPS (360,361). Des cellules placentaires humaines (HPC) se sont également révélées efficaces pour la propagation à long terme des hPSCs (362,363).

Cependant, le risque de contamination par des agents infectieux humains viraux ou non (prions) existe (352). Pour surmonter ce problème, il est possible d'utiliser des cellules autologues,

fibroblastes ou cellules souches adipocytaires, non seulement pour la génération de cellules iPS mais également en tant que cellules nourricières pour leurs propres cellules iPS (364–366).

Toutes ces cellules nourricières présentent des capacités différentes à maintenir la culture des hPSCs. En effet, l'expression et la sécrétion des différents facteurs est inconstante entre les différentes lignées (367). Par exemple, il a été montré que l'efficacité des HFF est plus faible que celles des MEF dû à un plus faible niveau de sécrétion d'activine A (368). A l'inverse, les lignées nourricières humaines telles que les HFF, HPC et HBMSC synthétisent naturellement du bFGF (360,367).

La prolifération de ces cellules nourricières doit être inactivée par irradiation ou traitement avec de la mitomycine C, tout en permettant l'expression et la sécrétion des facteurs indispensables au maintien de la culture des hPSCs. Or, l'irradiation gamma peut induire leur apoptose et risquer donc d'altérer la sécrétion des facteurs solubles et la formation de la MEC (344). De plus, la production à grande échelle de cellules souches est difficilement possible par cette technique de culture.

▪ **Culture sur matrice extracellulaire (MEC)**

S'affranchir des cellules nourricières, même d'origine humaine, est une étape importante vers l'utilisation des hPSCs dans un but thérapeutique. Cependant, les interactions cellule-matrice vont, comme *in vivo*, jouer un rôle critique dans le contrôle de l'apoptose, la quiescence, l'auto-renouvellement ou la différenciation des cellules souches. De nombreux substrats mimant la MEC ont donc été développés pour permettre la prolifération des cellules souches.

Le support mimant la MEC le plus employé est le MatrigelTM commercialisé par BD Biosciences. Il s'agit d'un extrait protéique de sarcome murin Engelbreth-Holm-Swarm (369) contenant principalement de la laminine, du collagène IV et de protéoglycanes à héparane sulfate (370), mais également des facteurs de croissance et d'autres composés non définis. Il a souvent été utilisé en association avec du milieu de culture conditionné par des MEFs (MEF-CM) (371) ou plus récemment avec des milieux sans sérum. Cependant, il existe une variabilité inter-lot et ce produit introduit des contaminants xénogéniques.

Ludwig *et al.* ont montré que le MatrigelTM pouvait être remplacé par différentes protéines matricielles comme le collagène IV, la vitronectine, la fibronectine et la laminine, soit mélangées (372), soit utilisées seules (373). La laminine est la première protéine de la matrice extracellulaire exprimée lors du stade 2-4 cellules du développement embryonnaire, les isoformes -111, -332 et -511 supportent l'adhésion et la prolifération des hESCs (374). L'isoforme -511 recombinante humaine permet notamment la culture à long terme des hPSCs (375). La vitronectine (376–378) est

actuellement commercialisée par StemCell™ Technologies. La E-cadhérine, un médiateur des interactions cellule-cellule, permet également la formation des colonies et l'auto-renouvellement des hESCs (349,379,380). L'utilisation de toutes ces protéines sous forme recombinante humaine représente une avancée majeure vers l'utilisation clinique des hPSCs car le support de culture est ainsi entièrement défini et exempt de toute substance xénogénique. Différentes équipes ont montré la réduction de l'expression du Neu5Gc, utilisé comme marqueur indicatif de la contamination de cellules humaines par des xénoantigènes, dans des conditions de culture sans cellules nourricières ni sérum (372,381).

▪ **Culture sur substrats/surfaces synthétiques**

Des substrats synthétiques ont été développés pour mimer des molécules biologiques et interagir avec des intégrines ou autres molécules à la surface des hPSCs (Figure 14). Ils sont caractérisés par leur balance hydrophilie/hydrophobie et leur rigidité. En effet, l'hydrophobie empêche l'adhérence et un support plus rigide permet l'auto-renouvellement alors qu'un support plus mou risque d'induire la différenciation. C'est entre autre grâce à leurs propriétés chimiques et mécaniques qu'ils vont permettre la culture des hPSCs. Parmi les polymères synthétiques, on peut citer le poly(methyl vinyl ether-alt-maleic anhydride) (PMVE-alt-MA) (382), des surfaces présentant des peptides liant l'héparine (383), des polymères riches en résidus d'acrylate (384,385), divers hydrogels (386) et notamment des hydrogels d'aminopropylméthacrylamide (APMAAm) (387) ou de poly[2-(methacryloyloxy)ethyl dimethyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide] (PMEDSAH) (388,389). Bien d'autres ont également été développés (390). Certains supports synthétiques ont récemment été commercialisés pour la maintenance des cellules iPS humaines, tels que HyStem-C™ (Sigma-Aldrich), un hydrogel riche en acide hyaluronique (391), ou une surface Synthemax® (Corning) portant un motif RGD (Arg-Gly-Asp) qui contient un petit peptide dérivé de la vitronectine, et immobilisé sur un support recouvert d'acrylate (392).

Ces supports présentent l'avantage d'être parfaitement définis, reproductibles, stables, avec peu de variation inter-lot, stérilisables et surtout exempts de tous contaminants infectieux ou immunogènes.

Bien que non détaillées dans cet exposé, il est à noter que d'autres techniques de culture sont en plein développement telles que les techniques de micro- et nano-ingénierie qui permettent un contrôle et une régulation précise des stimuli biochimiques et biomécaniques agissant sur les cellules souches (393,394).

▪ Culture en suspension et bioréacteurs

Même si les hPSCs sont traditionnellement cultivées sous forme de colonies adhérentes en 2D dans des flasques de culture, plusieurs équipes ont développé des techniques de culture 3D dans lesquelles les hPSCs sont mises à adhérer sur des microtransporteurs/billes formés de différents matériaux et coatés ou non (395–397). Ce système 3D présente l'avantage d'augmenter la surface de culture et donc la production de hPSCs. Cependant, il peut être difficile de décoller ensuite les cellules et d'éliminer les billes lors des passages. De plus, des matériaux d'origine animale et non définis comme le MatrigelTM ont été parfois utilisés pour recouvrir les billes et augmenter l'adhérence cellulaire.

Plus récemment, il a été montré que, cultivées dans un milieu approprié sans sérum, ces cellules peuvent pousser sous forme d'agrégats sphéroïdes en suspension. La culture en suspension des cellules souches pluripotentes serait donc une alternative efficace et facile à mettre en œuvre pour une expansion à grande échelle. Les hPSC ont ainsi pu être cultivées dans différents types de récipients : disques Pétri (« statique ») aussi bien que flasques avec agitation rotative (« dynamique ») (398–401). Des cellules iPS ont même pu être dérivées avec cette technique de culture (402). Cependant, comme dans les cultures adhérentes, la composition du milieu dans ces cultures en suspension « statiques » ou « dynamiques » n'est jamais stable puisqu'elle subit des changements rapides dus au relargage ou à la consommation de nombreux métabolites. De plus, la dissociation des agrégats lors des passages peut augmenter la mortalité des cellules.

L'utilisation de bioréacteurs dans lesquels du milieu de culture frais est perfusé de façon continue représente une évolution prometteuse (403–405). Les différents paramètres tels que pH, oxygène, glucose, lactate, acides aminés, dopamine... sont rigoureusement contrôlés pour une meilleure optimisation et reproductibilité des cultures.

En conclusion, les cultures sur cellules nourricières ou MEC sont les plus utilisées et leurs rendements sont équivalents, mais uniquement adaptées pour un usage en recherche. Seules les cultures en suspension 3D permettent l'expansion à grande échelle nécessaire pour une application thérapeutique et le développement industriel. Le taux de prolifération est également bien plus élevé que dans des cultures classiques « statiques » avec ou sans cellules nourricières.

4.1.2. L'atmosphère

Les cellules sont généralement maintenues dans des incubateurs en conditions normoxiques (21 % d'O₂). Or, la pO₂ physiologique est bien inférieure (7-0,7 %), et celle dans les « niches » où se

localisent les cellules souches est variable, mais toujours inférieure à la pO_2 atmosphérique. Cultiver les cellules souches *in vitro* en conditions d'hypoxie aurait donc un effet bénéfique sur la prolifération (406,407), et il a été montré une réduction significative de la différenciation de cellules hES cultivées dans de telles conditions (408). Cependant, maintenir une telle pO_2 stable et uniforme pour toutes les cellules dans la flasque de culture demande une installation sophistiquée dans le laboratoire. Il faut en effet changer le milieu de culture et effectuer les passages sous une hotte en hypoxie puisque l'équilibration de la pO_2 peut nécessiter plusieurs heures (409).

5. Caractérisation des cellules iPS

Il est indispensable de bien caractériser les cellules iPS afin de sélectionner les lignées pluripotentes. De plus, des variations génétiques et épigénétiques pouvant apparaître dans ces cellules iPS, nous discuterons des différentes anomalies pouvant être retrouvées et de l'intérêt ou non de les rechercher.

5.1. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules iPS

Les critères pour caractériser les cellules iPS et définir leur pluripotence sont identiques à ceux utilisés lors de la dérivation de nouvelles lignées de cellules ES. Ces différents critères sont la morphologie, la culture cellulaire, des marqueurs moléculaires ainsi que des capacités fonctionnelles.

Les cellules iPS possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques que les cellules ES : une forme ronde, un noyau avec un large nucléole, et un cytoplasme peu abondant. Leur méthode de culture, comme vu précédemment, est identique à celle des cellules ES, avec un temps de doublement comparable et illimité *in vitro* lorsque la culture est réalisée dans des conditions optimales (233).

La sélection des colonies iPS après reprogrammation peut se faire par l'activité de la phosphatase alcaline (410). Puis, l'une des premières étapes de caractérisation consiste à vérifier l'inactivation des transgènes (quand utilisation de vecteurs intégratifs) puisque la reprogrammation complète des cellules iPS nécessite l'extinction progressive de l'expression des transgènes au profit d'une expression endogène. Les cellules iPS reprogrammées expriment à leur surface des marqueurs de pluripotence tels que SSEA (*stage specific embryonic antigen*)-3, SSEA-4 (ou SSEA-1 chez la souris), TRA (*tumor related antigen*)-1-60, TRA-1-81 ainsi que des facteurs de transcription tels que Oct4, Sox2, Nanog à des niveaux comparables à ceux des cellules ES (411). Ces différentes analyses

peuvent se faire par cytométrie en flux, immunofluorescence, Western Blot ou par PCR (233). De plus, l'activité télomérase est élevée dans les cellules iPS (256).

La caractérisation fonctionnelle des cellules iPS peut se faire *in vitro* ou *in vivo*. En effet, les cellules iPS sont capables de former spontanément *in vitro* des structures 3D appelées corps embryoides (EBs, *Embryoid bodies*), ou de former *in vivo* des tératomes quand elles sont injectées en sous-cutané dans des souris immunodéprimées. Ces EBs et tératomes, constitués de types cellulaires dérivés des trois lignées embryonnaires (mésoderme, ectoderme et endoderme), permettent de démontrer la pluripotence des cellules iPS humaines et murines. Ce test de formation de tératome (avec analyse histologique et immunohistochimique) est considéré comme le « gold standard » pour la caractérisation des cellules iPS humaines bien qu'il ne soit pas aussi rigoureux que ceux disponibles chez la souris. En effet, il existe d'autres tests pour les iPS d'origine murine. Après injection dans des blastocystes, celles-ci vont contribuer au développement embryonnaire et à la formation de chimères adultes, avec une transmission germinale. La complémentation tétraploïde est le test de pluripotence le plus exigeant pour les iPS murines. Il consiste à injecter des cellules iPS murines dans des embryons modifiés tétraploïdes puis à évaluer la capacité des cellules iPS à conduire au développement d'un organisme entier pour conduire à la génération d'une souris viable et fertile (412,413).

5.2. Variations génétiques et épigénétiques

Des variations génétiques et épigénétiques ont été décrites dans les cellules iPS. Elles peuvent être identiques à celles déjà observées dans les cellules ES ou au contraire spécifiques. Au sein même des cellules iPS, des variations peuvent distinguer deux lignées, ou différents passages pour une même lignée, et même différentes populations présentes lors d'un passage donné. Certaines de ces variations peuvent affecter les propriétés des cellules iPS et donc leur utilisation thérapeutique (Figure 16).

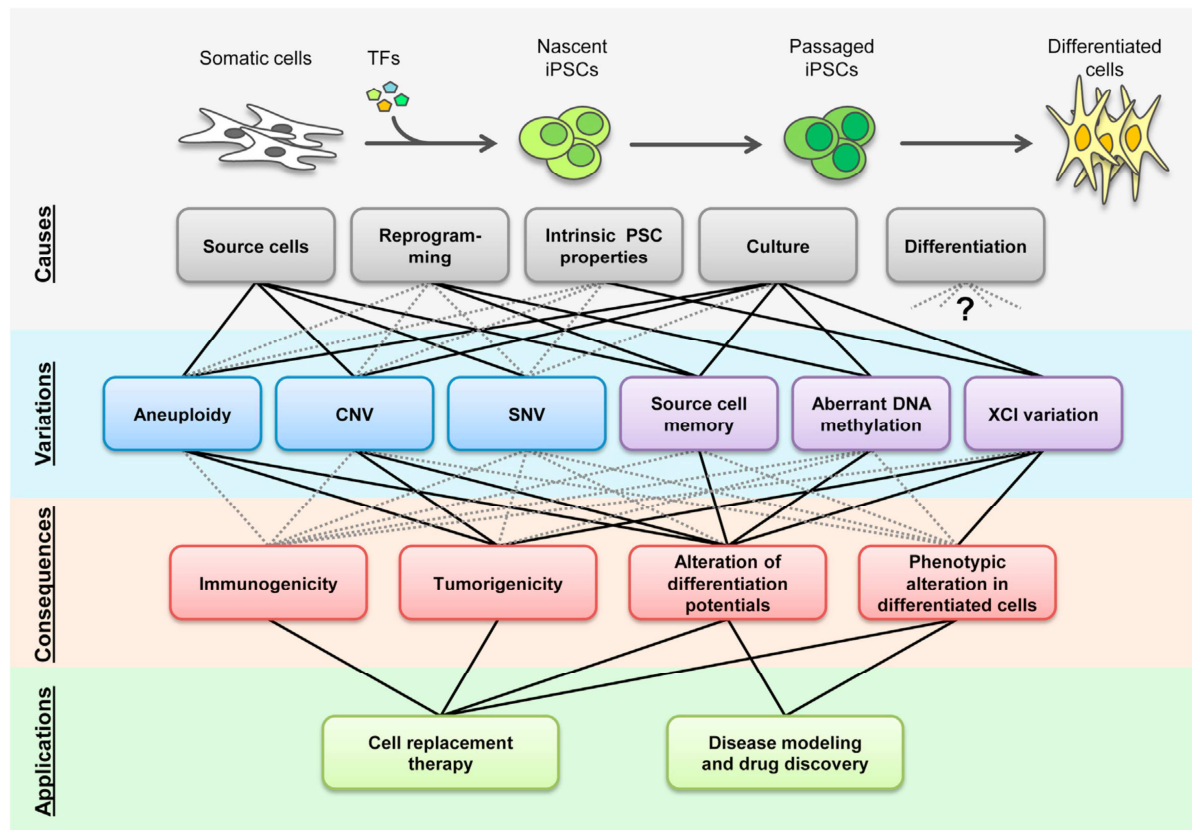


Figure 16. Variations génétiques et épigénétiques, leurs causes, leurs conséquences fonctionnelles et leurs impacts sur les applications. D'après (414) Liang and Zhang, *Cell Stem Cell* (2013).

▪ Les variations génétiques

Les cellules iPS peuvent être porteuses de différentes anomalies génétiques, telles des aneuploïdies, des variations du nombre de copies (CNV) de région du génome ou des variations nucléotidiques (SNV). Ces anomalies sont présentes dans les cellules sources ou apparaissent lors de la génération des cellules iPS ou de leur maintenance en culture (Figure 16).

Les aneuploïdies : Ces anomalies du nombre des chromosomes sont fréquemment rapportées dans les cellules iPS. Il est estimé qu'au moins 13 à 30 % des lignées ES ou iPS analysées développent des anomalies du caryotype au moins lors d'un passage. Dans plus de la moitié des cas, il s'agit d'un gain d'un chromosome, notamment le chromosome 12, mais également les chromosomes 8, 20 et plus rarement X. Les trisomies 17 seraient plus fréquentes pour les cellules ES que pour les cellules iPS (415–417). Les aneuploïdies seraient positivement sélectionnées au cours de la culture car un accroissement de leur fréquence est constaté au fur et à mesure des passages. En effet, l'augmentation du dosage de certains gènes impliqués dans l'auto-renouvellement et la prolifération procurerait un avantage de croissance. La fréquence élevée des trisomies 12 serait ainsi expliquée

par la présence des gènes de pluripotence *NANOG* et *GDF3* portés par ce chromosome (417,418). Mais les cellules sources peuvent également être responsables de cette aneuploïdie (Figure 16). Des fibroblastes de patients atteints de trisomie 21 ont été reprogrammés avec succès en cellules iPS (419). Ce type d'anomalies, de taille supérieure à 10 Mb, peut être détecté par un caryotype (bandes R et/ou G) ou par FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*).

Les variations subchromosomiques (CNV) : Ces variations concernent une région du génome supérieure à 1 kb, contenant ou pas des gènes et dont le nombre de copies varie d'un individu à l'autre. Leur présence chez les cellules iPS serait majoritairement due aux cellules sources et à la culture extensive plus qu'au processus de reprogrammation (420). Ces CNVs peuvent être des duplications ou des délétions (pouvant entraîner une perte d'hétérozygotie (421)). Les duplications d'oncogènes sont reliées à la culture intensive alors que les délétions sont généralement associées aux gènes suppresseurs de tumeur et se produisent préférentiellement lors de la reprogrammation (Figure 16) (422). Par exemple, les amplifications 17q12 et 20q11.21 sont fréquemment retrouvées dans les cellules ES et iPS (418,423,424). Leur détection peut se faire par analyse chromosomique sur puce à ADN ou CGH array (*Comparative Genomic Integration*) et SNP array (*Single Nucleotide Polymorphism*) (424,425).

Les variations de nucléotides (SNVs) : Le séquençage complet du génome de différentes lignées iPS humaines a révélé la présence de plus d'un millier de SNVs (mutations non-sens, faux-sens ou variants d'épissage) pour chacune des lignées analysées, mais seulement une douzaine au niveau de gènes codant pour des protéines, et cela, indépendamment de la méthode de reprogrammation employée ou du type cellulaire d'origine. Là encore, les cellules d'origine seraient la principale source des SNVs retrouvés dans les cellules iPS (Figure 16) (426–428). Pour l'instant, aucune étude n'a pu montrer si ces SNVs faciliteraient ou non la reprogrammation (429).

Seules les aneuploïdies et les CNVs ont des conséquences mesurables. Le risque tumorigène non négligeable ainsi que la modification du potentiel de différenciation sont à prendre en compte non seulement pour la thérapie cellulaire, mais également pour la modélisation physiopathologique (Figure 16).

▪ Les variations épigénétiques

La reprogrammation des cellules somatiques en cellules iPS implique l'effacement du profil épigénétique de la cellule somatique et l'établissement de nouvelles marques avec reconfiguration

de la structure chromatinienne : méthylation de l'ADN, modifications d'histones, remodelage des nucléosomes... (414).

La mémoire épigénétique : Malgré la reprogrammation, les cellules iPS conservent une « mémoire épigénétique » du tissu donneur dont elles sont issues (Figure 16). Les mécanismes mis en jeu ne sont pas entièrement élucidés mais les méthylations de l'ADN sont clairement impliquées. Il existe une balance complexe, cruciale pour la reprogrammation, entre déméthylation (activation de la transcription) et méthylation (répression) de l'ADN au niveau des promoteurs de gènes. En effet, la déméthylation de l'ADN étant un processus lent et plutôt inefficace, et de plus se produisant tardivement lors de la reprogrammation, il resterait une signature de méthylations résiduelles caractéristique du tissu d'origine (271). Or, ces marques épigénétiques sont des mécanismes répresseurs dans les cellules somatiques afin de prévenir l'expression involontaire de gènes d'autres lignages (430), et leur persistance à l'issue de la reprogrammation va s'opposer à l'activation de certains de ces gènes. Ces méthylations résiduelles peuvent être remise à zéro par des différenciations et reprogrammations successives, par traitement par des agents modifiant la chromatine, ou au cours de la culture. Au contraire, une méthylation incomplète de l'ADN au niveau des promoteurs de gènes somatiques est responsable, à faibles passages, de leur expression persistante (431,432). Il a été montré que ces gènes incomplètement réprimés n'ont pas une distribution aléatoire : ils ont tendance à être isolés des autres gènes qui eux subissent un *silencing* lors de la reprogrammation, indiquant un retard dans le recrutement de la machinerie de *silencing* (433). Ces hyper- et hypo-méthylations des différents gènes vont généralement orienter le potentiel de différenciation en faveur du lignage de la cellule source (271,431,434).

Les méthylations aberrantes de l'ADN : Lors de la reprogrammation, le statut de méthylation de l'ADN peut être altéré et conduire à un profil caractéristique des cellules iPS, distinct de celui des cellules source (et donc de la mémoire épigénétique) et des cellules ES (435–437). Ces aberrations (hyper- ou hypométhylations) peuvent être uniques ou partagées par plusieurs lignées iPS (438). Elles peuvent toucher des gènes impliqués dans les processus développementaux (439), des régions d'empreinte génomique plus particulièrement vulnérables (440,441), mais également d'autres régions génomiques comme les télomères et centromères (436). La culture prolongée va réduire ces variations de méthylations mais également créer de nouvelles aberrations de méthylations (437). Ces variations peuvent être transmises lors de la différenciation et potentiellement affecter les propriétés des cellules différenciées (Figure 16) (432,436).

La réactivation du chromosome X : Chez les Mammifères, lors du développement embryonnaire, les cellules somatiques femelles inactivent au hasard la quasi-totalité d'un des deux chromosomes X afin d'égaliser la dose des gènes liés à l'X dans les deux sexes (statut XaXi). Lors de la reprogrammation de cellules somatiques humaines en cellules iPS, contrairement à ce qui est observé avec les cellules iPS d'origine murine, il n'y a généralement pas de réactivation du chromosome X inactivé (statut XaXi). Mais, lors de cultures prolongées, un phénomène d'« érosion » va conduire à la perte du statut Xi dans les cellules iPS (statut XaXe) (440,442). Etrangement, le chromosome X est également inactivé dans les cellules ES, et le phénomène d'érosion est fréquent (443). Pourtant, il peut parfois se produire une réactivation correcte dans certaines lignées ou sous-populations de cellules iPS (444). Ce statut activé ou inactivé serait dépendant de la technique de reprogrammation ainsi que des conditions de culture (445). Ces phénomènes ont d'importantes implications pour la modélisation *in vitro* de pathologies liées à l'X dominantes comme le syndrome de Rett (446). En effet, l'érosion du chromosome Xi peut d'une part entraîner la disparition du phénotype pathologique par réactivation de l'expression du gène non muté, mais également faire apparaître un nouveau phénotype non lié à la pathologie par l'augmentation de l'expression de gènes dont des oncogènes, et donc induire un risque tumorigénique (Figure 16).

Pour conclure, de nombreux facteurs peuvent influencer l'expression génique dans les cellules iPS : le fond génétique, le type de cellules somatiques d'origine, la méthode de reprogrammation, les conditions de culture, le nombre de passages... Etablir systématiquement le profil génétique et épigénétique des cellules iPS permettrait quasiment d'exclure les lignées potentiellement oncogéniques. Actuellement, cela n'est pas réalisable en routine pour chaque nouvelle lignée de cellules iPS générée. De plus, il a été montré que la différenciation *in vitro* des cellules iPS en cellules somatiques introduirait également des aberrations génétiques et épigénétiques qui, en s'accumulant, auraient des conséquences fonctionnelles similaires à celles apparaissant lors de la reprogrammation ou de la culture dans les cellules iPS (422). D'autres études sont nécessaires pour déterminer précisément l'impact de telles anomalies pour une application clinique (447).

6. Vers des applications porteuses d'espoir

Malgré la très grande ressemblance des cellules iPS avec les cellules ES, elles ne permettent pas de les remplacer totalement, notamment pour étudier le développement embryonnaire et humain en général (277). Par contre, les recherches menées en parallèle sur ces deux types de cellules pluripotentes bénéficient des avancées l'une de l'autre. En recherche fondamentale, les cellules iPS

permettent la compréhension des mécanismes impliqués dans la reprogrammation, l'auto-renouvellement, la pluripotence ainsi que la différenciation.

Les champs d'applications des cellules iPS recoupent ceux déjà connus pour les cellules ES, à savoir la différenciation cellulaire pour des analyses de toxicologie, la modélisation physiopathologique, le screening de nouveaux médicaments, la thérapie cellulaire/médecine régénératrice et la thérapie génique (Figure 17).

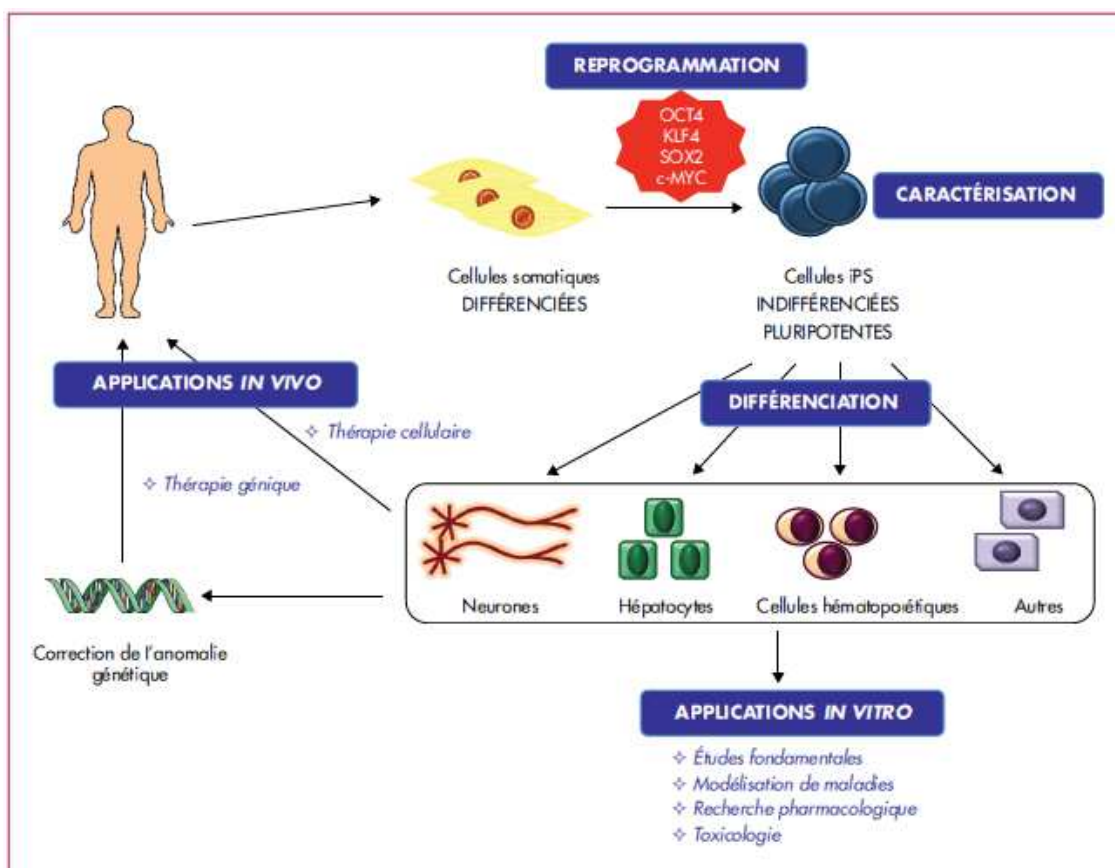


Figure 17. Les applications des cellules iPS. D'après (305) Antony-Debré et al., *Hématologie* (2013).

6.1. Applications *in vitro* et *in vivo*

6.1.1. Modélisation cellulaire, thérapie cellulaire et toxicologie

Les cellules iPS peuvent être théoriquement différenciées en tous les types cellulaires de l'organisme. Leur différenciation a été réalisée avec succès en cellules hématopoïétiques (448), cardiaques (449), neurales (450), hépatiques (451,452), épithélium pigmenté de la rétine (453)...

Avec la mise au point de protocoles de différenciation reproductibles et efficaces, il sera possible d'obtenir des quantités potentiellement illimitées de cellules différenciées. La technologie

des cellules iPS ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour la génération de cellules transplantables autologues ou allogéniques afin de remplacer ou réparer les tissus endommagés par une lésion ou une maladie. Dans des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (454), des pathologies métaboliques comme le diabète de type 1 (455), des pathologies cardiaques (456) ou hépatiques (457), des lésions de la moelle épinière (458), les essais de transplantation chez des rats ou souris modèles ont donné des résultats très encourageants. Par contre, ces approches de thérapie cellulaire ne sont pas adaptées pour traiter des pathologies liées à des désorganisations cellulaires complexes comme certaines anomalies développementales du cerveau.

L'utilité des cellules iPS dans le domaine de l'hématologie est également parfaitement démontrée, notamment en permettant la production de globules rouges (459,460) ou plaquettes (461,462) en quantité quasi illimitée à partir de cellules iPS humaines. La constitution d'une banque de cellules iPS sélectionnées sur leur phénotype permettrait de disposer d'une source de cellules parfaitement caractérisées et contrôlées. Ainsi, 3 lignées seulement permettraient de couvrir 99 % des besoins transfusionnels en globules rouges (463). Pour l'instant, les CSH produites directement à partir de cellules iPS ne permettent pas de reconstituer l'hématopoïèse à long terme après transplantation. Seules des CSH issues de tératomes (formés par injection sous-cutanée de cellules iPS), sélectionnées et transplantées chez des souris irradiées ont permis de générer des souris avec un système hématologique et immunitaire humain (464,465). Le développement et l'amélioration de ces techniques de production de CSH seraient inestimables pour le traitement de pathologies comme la Granulomatose Septique Chronique pour lesquelles le seul traitement curatif est l'allogreffe de CSH.

En Juillet 2013, le ministère japonais de la Santé a donné son accord pour débiter les premiers essais cliniques de médecine régénérative sur l'homme à l'aide des cellules iPS. Ce 1^{er} essai clinique sera conduit par la Fondation pour la Recherche Biomédicale et l'Innovation de Kobé et sera réalisé sur des patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), qui est la première cause de cécité des plus de 55 ans dans les pays industrialisés.

En toxicologie, plus de 40 % des drogues testées lors d'essais cliniques sont abandonnées à cause de l'apparition d'effets toxiques inattendus. Les cellules iPS différenciées, spécifiques de pathologies ou non, peuvent servir de modèles prédictifs *in vitro* pour évaluer la toxicité pré-clinique de nombreuses molécules ou nouveaux médicaments, et cela à moindre coût (466). Elles sont notamment tout particulièrement utiles pour évaluer la cardiotoxicité (467) et l'hépatotoxicité (468). De plus, cette nouvelle technologie permet de générer des panels de lignées cellulaires reproduisant la diversité génétique et épigénétique de la population présentant des polymorphismes pouvant

influencer le métabolisme ou l'élimination de certaines molécules (par exemple des polymorphismes du cytochrome P450) (469).

La différenciation spontanée de cellules ES murines en corps embryoides avec battements cardiaques est actuellement utilisé par l'industrie pharmaceutique comme modèle *in vitro* pour prédire la tératogénicité (470). Or, ces analyses toxicologiques peuvent également être réalisées directement sur les cellules iPS humaines pour observer un effet tératogène plus prédictif sur le développement embryonnaire humain (466).

6.2. Modélisation physiopathologique, développement de nouveaux médicaments et thérapie génique

Les chercheurs se sont très rapidement intéressés à la modélisation physiopathologique en utilisant des cellules somatiques issues de sujets malades. Depuis les premières modélisations réalisées en 2008 [Park], des lignées d'iPS ont été générées pour la modélisation de pathologies neurologiques comme la sclérose latérale amyotrophique (471), la maladie de Huntington (419) et la maladie de Parkinson (313), de pathologies hématopoïétiques comme la polyglobulie de Vaquez (472), la β -thalassémie et la drépanocytose (473), ou des pathologies métaboliques, cardiovasculaires... Cette technologie permet ainsi de créer des modèles de pathologies pour lesquelles il n'existait jusqu'à présent aucun modèle *in vitro*. De plus, cette technologie peut se révéler intéressante dans le cas de pathologies touchant plusieurs tissus.

Ces modèles permettent d'étudier les mécanismes sous-jacents à une pathologie, d'identifier un phénotype particulier associé à celle-ci, et également de tester de nouvelles approches de thérapies potentiellement curatives. Des neurones modélisant le syndrome de Rett (maladie neurodégénérative due à une mutation du gène codant MeCP2 situé sur le chromosome X) ont permis de tester l'efficacité de différentes drogues et leur phénotype a ainsi pu être partiellement corrigé par l'administration d'IGF1 (474). Pour l'instant, même si ces modèles n'ont encore pas permis le développement de nouveaux médicaments, la mise en place de plateformes représenterait un outil inestimable pour permettre le criblage de nombreuses molécules et évaluer leur efficacité à corriger le phénotype malade (475,476).

Dans le cas de maladies constitutionnelles monogéniques, il est théoriquement possible de corriger l'anomalie génétique portée par les cellules iPS issues du patient, puis de les différencier en cellules d'intérêt et ensuite de les réintroduire chez le patient. La correction génétique peut être réalisée par l'utilisation de vecteurs viraux intégratifs (rétrovirus, lentivirus) mais, comme discuté précédemment, elle est limitée par le risque d'insertion mutagène. L'évolution actuelle repose sur le

ciblage génique grâce au mécanisme de recombinaison homologue qui utilise la machinerie cellulaire de réparation de l'ADN pour remplacer la séquence mutée par une séquence saine. La technologie du « *genome editing* » améliore ce mécanisme de correction grâce à l'utilisation de nucléases ZFN (*Zinc Finger Nuclease*) (477) ou TALEN (*Transcription activator-like effector nuclease*) (478) permettant d'induire des cassures double-brin dans l'ADN au niveau du gène ciblé, ce qui augmente la fréquence de recombinaison homologue et permet la correction de la mutation.

Les premiers essais de correction génétique ont été réalisés avec succès en 2009 dans l'anémie de Fanconi. Ce sont les kératinocytes et les fibroblastes du patient qui ont été corrigés grâce à un vecteur lentiviral car la mutation ne permet pas la reprogrammation en iPS (instabilité génétique et apoptose accrue). Dans ce cas particulier, cette thérapie génique a permis la reprogrammation en cellules iPS pour obtenir, par différenciation *in vitro*, des progéniteurs hématopoïétiques phénotypiquement normaux (479).

D'autres pathologies hématopoïétiques ont fait l'objet d'avancées prometteuses. Dans la drépanocytose, les cellules iPS obtenues à partir d'un modèle murin ont été corrigées par recombinaison homologue puis différenciées en cellules matures ou progéniteurs hématopoïétiques. Après transplantation de ces progéniteurs corrigés dans des souris irradiées, les anomalies biologiques ont été résolues (480). La correction a également été réalisée avec succès à partir de cellules iPS humaines grâce à la technique ZFN (481,482) et TALEN (483).

6.3. Modélisation physiopathologique de la CGD grâce à l'utilisation des cellules iPS

6.3.1. Les modèles de neutrophiles CGDX

Les travaux de différentes équipes ont permis la production de neutrophiles d'abord à partir de cellules ES murines (484) et humaines (485,486), puis plus tard à partir de cellules iPS murines (487) et humaines (448,488).

Seuls des neutrophiles modélisant la forme CGDX ont été produits par deux équipes. Celles-ci les ont également utilisés pour développer des approches de thérapie génique (487,488).

L'équipe de Mukherjee *et al.* a généré des cellules iPS-CGDX à partir de fibroblastes de souris modèle CGDX (487). Ils ont ensuite produit des progéniteurs hématopoïétiques qui, cultivés 1-2 semaines dans de la méthylcellulose (contenant différentes cytokines hématopoïétiques), ont donné naissance à des colonies CFU-G (*Granulocyte-Colony forming Unit*) contenant des neutrophiles matures. La correction génétique a été réalisée sur les EBs (6 jours après leur formation) par transfection à l'aide d'un vecteur lentiviral SIN codant l'ADNc fonctionnel de gp91^{phox}.

L'équipe de Zou *et al.* a utilisé des cellules iPS reprogrammées à partir de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse d'un patient mâle adulte atteint de CGDX (488). La différenciation hématopoïétique a été réalisée par formation de corps embryoides puis coculture sur cellules stromales selon la méthode développée par Yokoyama *et al.* (486). Ils ont obtenu une population de 30-40 % de neutrophiles matures. La correction génétique a été directement réalisée sur les cellules iPS grâce à la technologie de réparation ciblée utilisant la nucléase ZFN.

Dans ces deux articles, la restauration du phénotype a été obtenue avec succès et montrée par les tests NBT et DHR sur les neutrophiles produits.

6.3.2. Les modèles de macrophages CGDX et CGDAR47

A ce jour, une seule équipe a différencié des cellules iPS humaines en macrophages modèles des deux formes les plus courantes de CGD : la CGDX et la CGDAR47 (489). Ils ont ainsi généré une lignée iPS à partir des fibroblastes d'un patient CGDAR47 et deux lignées issues de deux patients CGDX. Puis ils ont utilisé une méthode de différenciation en monocytes et macrophages mise au point sur les cellules ES humaines (490). Ces macrophages sont phénotypiquement matures et, pour la lignée témoin, fonctionnels (phagocytose, production de cytokines et production de ROS analysée par chimiluminescence et par le test NBT). Au contraire, les lignées issues de patients donnent des résultats fonctionnels bien corrélés avec le diagnostic de CGD et aux monocytes/macrophages prélevés directement dans la circulation sanguine des patients.

Dans le cas de la CGD, deux modèles cellulaires (neutrophiles et macrophages), ont ainsi pu être produits *in vitro*. Les neutrophiles CGDX ont même pu être utilisés pour des essais de thérapie génique, et ces corrections génétiques ont permis la restauration du phénotype fonctionnel. La technologie des cellules iPS est donc très prometteuse dans le cadre de cette pathologie et, associée au développement des approches de thérapie cellulaire, notamment de transplantation de CSH, ouvre une nouvelle piste pour un traitement curatif.

Pour conclure, les cellules iPS présentent, par rapport aux cellules ES, une parfaite correspondance génétique avec le génome du patient puisqu'elles en sont issues, donc ne sont plus sujettes au phénomène de rejet en cas de transplantation. De plus, leur utilisation n'est pas limitée par des considérations éthiques. Cependant, il reste des obstacles à franchir avant l'utilisation clinique de ces cellules iPS. La plupart de ces obstacles ont déjà été discutés précédemment : utilisation d'une méthode de reprogrammation efficace et surtout sans risque d'intégration dans le génome, conditions de culture cellulaire sans produits d'origine animale et permettant une

production en quantité suffisante pour une utilisation thérapeutique... Mais il reste également le challenge de l'obtention de cellules différenciées complètement matures et fonctionnelles. En effet, les protocoles de différenciation n'étant pas efficaces à 100 %, des cellules indifférenciées ou différenciées vers d'autres types cellulaires que celui désiré peuvent contaminer l'échantillon administré au patient. Or, l'injection même d'une très faible quantité de cellules indifférenciées peut potentiellement entraîner la formation de tératome (491). Récemment, l'équipe de Lee *et al.* a identifié de petites molécules comme la quercétine qui peuvent inhiber efficacement les facteurs anti-apoptotiques exprimés par les cellules ES et iPS, conduisant ainsi à la mort cellulaire efficace et sélective des cellules pluripotentes indifférenciées (492). Des chercheurs ont également évoqué la possibilité d'inclure un « gène-suicide » dans les cellules reprogrammées pour les rendre sensibles à une drogue qui pourrait être administrée dans le cas où la transplantation induirait la formation de tumeur (333).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif de ce travail a été de mettre en place dans notre laboratoire une nouvelle approche de modélisation physiopathologique de la CGD liée à l'X grâce aux cellules iPS. En effet, les modèles d'étude cellulaires actuellement disponibles de la CGD ne reproduisent pas toutes les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules phagocytaires.

La première étape vers le développement de ces modèles est la maîtrise de la culture cellulaire et de la caractérisation des cellules iPS. Les cellules iPS utilisées pour cette étude ont été reprogrammées à partir de fibroblastes d'un patient CGDX et d'un sujet sain. Deux clones ont été produits pour chacune de ces lignées de cellules iPS. Ces quatre clones seront ainsi analysés selon la méthodologie décrite ci-dessous.

Différentes techniques de culture couramment employées seront testées. Puis, la caractérisation de la pluripotence des cellules iPS sera analysée, d'une part par l'expression de marqueurs de pluripotence, et d'autre part *in vitro* par la formation de corps embryoides et leur différenciation en cellules dérivées des trois lignages embryonnaires. Enfin, la technique de caryotype sera développée afin de vérifier la stabilité chromosomique des cellules iPS. Pour la lignée iPS-CGDX, la présence de la mutation dans le gène *CYBB* responsable de la pathologie sera vérifiée par séquençage.

Une fois ces cellules iPS validées, elles serviront à produire des modèles physiopathologiques *in vitro* de la forme CGDX afin de développer de nouvelles approches de thérapies, et notamment la thérapie protéique.

MATERIEL ET METHODES

1. Culture cellulaire

Les cellules sont manipulées stérilement dans un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II (BSC-EN, TechGen International). Les milieux de culture sont stérilisés à l'aide d'un filtre 0,22 µm en polyéthersulfone (PES) (Millipore) et conservés pendant maximum 2 semaines à +4°C.

1.1. Culture des fibroblastes CGDX

Obtention. Les fibroblastes d'un patient atteint de CGDX ont été obtenus à partir d'une biopsie cutanée effectuée selon le protocole de Recherche Clinique (FibroCGD) dont le CHU de Grenoble est promoteur. Ce protocole a été approuvé par le Comité de Protection des Patients (CPP Protocole 0922, n° : 09-CHUG-36). La collection de cellules a été déclarée à l'Afssaps (N°Afssaps ID RCB : 2009-A00944-53, version 1 du 24.09.09. réf : B91223-40). La mutation dans le gène *CYBB* à l'origine de la CGDX du patient est une mutation non-sens c.469C>T diagnostiquée dans notre laboratoire, le Centre de Diagnostic et Recherche sur la Granulomatose Septique (CDiReC) (81). La biopsie a été réalisée dans le service du Dr Brion (Service de Médecine Infectieuse, CHU de Grenoble) puis transportée à température ambiante dans un tube stérile contenant du milieu RPMI 1640 (Gibco) vers notre laboratoire.

Mise en culture de la biopsie. Immédiatement après réception, le prélèvement est coupé en fragments de 1 mm à l'aide d'un scalpel et mis en culture dans plusieurs flasques T25 avec 2 mL de milieu RPMI 1640 contenant 20 % de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco) inactivé 30 min à 56°C et 1 % de pénicilline 10000 unités/mL - streptomycine 10000 µg/mL (Gibco). Après 4 jours de culture dans une étuve à 37°C sous 5 % CO₂, 3 mL de milieu sont rajoutés. Le milieu est ensuite entièrement changé tous les 3-4 jours. Cette culture primaire dure 7-10 jours environ.

Cultures secondaires et passages. Lorsque la culture primaire a démarré avec prolifération des fibroblastes issus des fragments de la biopsie, les flasques T25 sont rincées deux fois avec du Dulbecco's Phosphate Buffer Saline 1X (DPBS), puis incubées avec 1 mL de trypsine 0,05 % (v/v) - EDTA 0,5 mM (Gibco) pendant 3 min à 37°C. Les cellules sont lavées avec 5 mL de milieu de culture secondaire (2 mL de milieu RPMI + 10 % de SVF + 1 % de pénicilline-streptomycine) et centrifugées 5 min à 500g pour éliminer la trypsine. Après comptage, 1,5.10⁶ cellules sont remises en culture dans 15 mL de milieu de culture/T75, c'est le passage numéro 1 (p1). Les cellules atteignent la confluence en 4-5 jours de culture à 37°C sous 5 % CO₂.

Congélation. Selon le même protocole que pour le passage, les flasques arrivées à confluence sont traitées avec de la trypsine 0,05 % - EDTA 0,5 mM pour décoller les cellules. Après rinçage avec du milieu de culture et centrifugation 5 min à 500g, le culot cellulaire est repris dans du milieu de congélation constitué de 90 % de SVF et 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO Hybrimax[®], ThermoFischer). Des ampoules de fibroblastes à passages p2 et p3 sont conservées dans l'azote liquide à -196°C.

1.2. Culture des fibroblastes embryonnaires murins MEFs

Obtention. Les cellules MEFs à passage p2 obtenues à partir de fœtus de souris entre 12,5 et 14,5 jours de gestation, sont fournies généreusement par le laboratoire du Pr Karl-Heinz Krause (Department of Pathology and Immunology, Université de Genève, Centre Médical Universitaire, Genève).

Cultures secondaires et passages. Les cellules MEFs sont cultivées en milieu MEF constitué de milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1X + GlutaMAX[™]-I (4,5 g/L glucose) (Gibco) avec 10 % de SVF, 1 % pénicilline-streptomycine et 1 % acides aminés non essentiels (Minimum Essential Medium-Non Essential Amino Acid (MEM-NEAA) 100X) (Gibco) à 37°C sous 5 % de CO₂.

Réalisés tous les 4-5 jours, les passages se font selon la procédure décrite précédemment pour les fibroblastes de patients (voir **1.1. Culture des fibroblastes CGDX**). Cependant, pour être utilisés en tant que cellules nourricières, les MEFs ne doivent pas être cultivés au-delà des passages 4 ou 5.

Inactivation mitotique des MEFs. Indispensable pour empêcher leur prolifération lors de la coculture avec les cellules iPS, deux techniques d'inactivation ont été testées sur des MEFs à passage p4-5 :

- ♦ Mitomycine C : les flasques de MEFs sont lavées avec 5 mL de PBS et 10 mL de milieu MEF contenant 10 µg/mL de mitomycine C (Sigma-Aldrich) sont ajoutés dans la flasque T75. Après 2,5-3h d'incubation dans une étuve à 37°C, le milieu est éliminé et les flasques sont rincées 2 fois en PBS puis traitées avec de la trypsine 0,05 % - EDTA 0,5 mM 3 min à 37°C. Après rinçage avec du milieu de culture, les cellules sont transférées en tube conique et centrifugées 5 min à 500g.

Tous les milieux ou matériels de laboratoire ayant été en contact avec la solution de mitomycine C sont éliminés dans une poubelle dédiée.

- ♦ Irradiation gamma : les MEFs, décollées des flasques de culture après traitement par la trypsine-EDTA et rinçage, sont irradiés à une dose de 50 Gy délivrée par un irradiateur IBL-637 avec l'aide du Dr Michel Diserbo, médecin en chef du Service de Radioprotection du Centre de Recherche du Service de Santé des Armées (CRSSA) ou avec l'aide du Dr David Laurin de l'Etablissement Français du

Sang (EFS) par un irradiateur Biobeam 2000 (Eckert & Ziegler, Allemagne). Ces deux irradiateurs contiennent une source de Césium 137.

Après inactivation, les MEFs peuvent être utilisés directement pour la culture des cellules iPS ou congelés pour une utilisation ultérieure.

Congélation. Les cellules MEFs, irradiées ou non, sont congelées dans 1 mL de milieu de congélation (90 % SVF + 10 % DMSO) et les ampoules conservées dans l'azote liquide.

1.3. Reprogrammation des fibroblastes en cellules iPS

Méthode de reprogrammation. Les fibroblastes de patients à passage p2 et/ou p3 sont ensuite envoyés au laboratoire du Dr Tomo Saric (Institute for Neurophysiology, Université de Cologne, Allemagne) qui produit les cellules iPS par transduction rétrovirale stable selon le protocole déjà publié (234) (Figure 18). Brièvement, les fibroblastes mis en culture à J-1 sont transfectés avec un rétrovirus *pMXs-based* (Addgene, Cambridge, MA) codant les 4 facteurs de transcription humains Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc (OSKM) en présence de 4 µg/mL de polybrène (Sigma, St Louis, MO) 8 heures/j pendant 2 jours. Puis à J3, les cellules sont cultivées en milieu DFBS contenant notamment du milieu DMEM (Gibco), 20 % SVF et 50 ng/mL de bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (Peprotech, Hamburg, Germany). A J6, 500 cellules/cm² sont finalement mises en culture sur des fibroblastes embryonnaires de souris CF1 irradiés et, à partir de J7, les cellules sont maintenues en milieu DFBS supplémenté avec 20 µg/mL d'acide ascorbique (AA) (Sigma-Aldrich) et 1 mmol/L d'acide valproïque (VPA) (Sigma-Aldrich). Des colonies ES-like sont observées 21-30 jours après la 1^{ère} transfection. Celles-ci sont isolées à l'aide d'une aiguille 22G pour expansion et validation (marqueurs de pluripotence et marquage de la phosphatase alcaline (AP)).

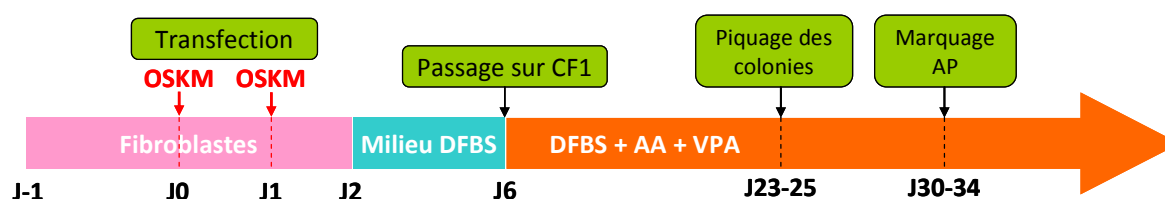


Figure 18. Protocole de différenciation des fibroblastes témoin et CGDX en cellules iPS par transduction rétrovirale à l'aide d'un vecteur OSKM.

Lignées iPS utilisées. A partir des fibroblastes du patient CGDX, plusieurs clones de cellules iPS ont été générés. Ils sont appelés NP21 clone 1 et clone 6.

Les clones d'une lignée de cellules iPS témoin, produite à partir d'un donneur sain et généreusement fournie par le Dr Saric, sont appelés NP26 clone 3 et clone 4.

1.4. Culture des cellules iPS

Les cellules iPS sont cultivées, amplifiées et maintenues dans un état indifférencié. Deux techniques de culture ont été testées : la culture sur cellules nourricières murines (MEFs) et la culture sur matrice extracellulaire Matrigel™ hESC-qualified Matrix (BD Biosciences) ou Vitronectine XF™ (StemCell™ Technologies).

1.4.1. Préparation des plaques de culture

Préparation des puits de culture avec les MEFs. Les MEFs irradiés (frais ou après congélation/décongélation) sont mis en culture dans des puits de plaques 6 puits à une densité de 2.10^4 cellules/cm². Ces puits ont été préalablement traités avec une solution aqueuse de gélatine 0,1 % (p/v, Sigma-Aldrich) la veille ou au minimum pendant 3 heures avant utilisation. Les cellules sont ensuite incubées pendant au minimum 24h dans l'étuve en milieu MEF et utilisables comme cellules nourricières pendant 7 jours maximum.

Préparation des puits traités par du Matrigel™. Les puits d'une plaque 6 puits sont traités par du Matrigel™ hESC-qualified Matrix selon les instructions du fournisseur : un aliquot de Matrigel™, dont le volume est déterminé pour chaque lot, est dilué dans 25 mL de milieu DMEM/F-12 Nutrient Mixture (Ham) (1:1) (1X) (Gibco). Les puits de la plaque sont traités par ajout de 1 mL de solution et incubés à température ambiante au moins 1h avant utilisation. Le Matrigel™ est ensuite éliminé par aspiration au moment de la mise en culture.

Préparation des puits traités avec la Vitronectine XF™. Les puits d'une plaque 6 puits non traitée pour la culture cellulaire (fournie dans le kit) sont traités avec de la Vitronectine XF™ diluée à 10 µg/mL dans du CellAdhere™ Dilution Buffer. Les puits de la plaque sont traités par ajout de 1 mL de solution, incubés à température ambiante au moins 1h avant utilisation puis rincés avec 1mL de CellAdhere™ Dilution Buffer avant la mise en culture des cellules iPS.

1.4.2. Culture des cellules iPS

Milieu de culture. Le milieu de culture est fonction de la technique utilisée :

- pour la culture sur MEFs, le milieu utilisé, appelé milieu iPS, est composé de milieu DMEM/F-12, additionné de 20 % KnockOut™ Serum Replacement (KOSR, Gibco), 1 % MEM-NEAA, 2 mM L-

glutamine 100X (Gibco), 100 μ M 2- β mercaptoethanol (2- β ME) (Sigma-Aldrich) et de 8 ng/mL bFGF humain (Miltenyi Biotec).

- pour la culture sur matrice extra-cellulaire (MatrigelTM et Vitronectine XFTM), nous avons utilisé le milieu mTeSRTM-E8TM (StemCellTM Technologies) conseillé avec ces supports.

Décongélation (sur MEFs). Les ampoules sont rapidement décongelées au bain-marie à 37°C jusqu'à ce qu'il ne reste d'un fin glaçon dans l'ampoule. 1 mL de milieu iPS préchauffé à 37°C est ajouté goutte à goutte dans l'ampoule puis le contenu de l'ampoule est transféré dans un tube conique de 15 mL contenant 9 mL de milieu de culture également préchauffé. Après 5-10 min pendant lesquelles les colonies sont laissées à sédimenter, le culot est repris dans du milieu de culture additionné de Thiazovivine (Tzv) 2 μ M (Miltenyi Biotec) et transféré dans les puits d'une plaque 6 puits déjà préparée avec les MEFs.

Culture. Les cellules iPS sont cultivées dans 2,5 mL de milieu de culture/puits à 37°C sous 5 % de CO₂ en condition normoxique, et le milieu de culture est changé 2 jours après le passage ou la décongélation puis tous les jours. Les cultures sont soigneusement observées tous les jours pour vérifier l'absence de contamination ou de phénomène de différenciation à l'aide d'un microscope inversé Leica DM IL équipé d'un appareil photo numérique Leica D-LUX 3 pour la prise des images. Il faut généralement 6-7 jours de culture après la décongélation ou 4-6 jours après un passage pour que les colonies atteignent une taille correcte.

Passage. La technique de passage des cellules iPS est fonction de la méthode de culture :

- pour la culture sur MEFs, le milieu de culture est aspiré et 0,5 mL de collagénase IV 1mg/mL (Gibco) préchauffée est ajouté dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée pendant 7 min à l'étuve puis la collagénase est aspirée. Puis, 2 mL du milieu de culture iPS sont rajoutés dans chaque puits et les colonies sont décollées avec précaution à l'aide d'un grattoir puis transférées dans un tube conique où elles sont laissées à sédimenter pendant 5-10 min. Le surnageant de culture est ensuite aspiré et le culot repris avec le milieu de culture supplémenté avec 2 μ M de Tzv. Les colonies sont fragmentées en petits agrégats par légère aspiration/refoulement puis transférées dans les puits de culture.

- pour la culture sur matrice extracellulaire, il est nécessaire d'utiliser une méthode de dissociation non-enzymatique. Après aspiration du milieu de culture et ajout de 1 mL/puits de Gentle Cell Dissociation Reagent (StemCellTM Technologies), les colonies sont incubées 6-8 min quand il s'agit de cultures utilisant le MatrigelTM, ou 10-12 min dans le cas de la Vitronectine XFTM. Le réactif de

dissociation est ensuite éliminé. Puis 2 mL du milieu de culture mTeSR™-E8™ supplémenté avec 2 µM de Tzv sont rajoutés dans chaque puits et les colonies sont décollées avec précaution à l'aide d'un grattoir puis transférées dans un tube conique. Les colonies sont ensuite immédiatement fragmentées en petits agrégats par aspiration/refoulement doux puis transférées dans les puits de culture.

Pour la transition culture sur MEFs - culture sur matrice extracellulaire, les colonies iPS ont été décollées des MEFs par la technique classique utilisant la collagénase IV. Mais lors des passages suivant, la procédure à suivre est celle détaillée ci-dessus. Il faut généralement 2 passages pour habituer les cellules et éliminer les MEFs restant.

Pour les deux techniques, le ratio de passage est de 1:4 à 1:6, voire plus, en fonction de la densité des colonies dans chaque puits.

Congélation des colonies cultivées sur MEFs. Après décollement des colonies de cellules iPS et sédimentation selon la procédure décrite précédemment, le culot est repris par un volume de 1 mL/ampoule du mélange de congélation suivant : 30 % de milieu iPS, KOSR 60 %, DMSO 10 % supplémenté de Tzv 2 µM.

2. Les corps embryoides (EBs)

Trois techniques ont été testées pour la formation des corps embryoides : la culture en suspension liquide en boîte de Pétri (493), le « hanging drop », et la technique de « spin ».

▪ Le transfert de colonies

Les colonies de cellules iPS sont décollées selon la même procédure que celle décrite pour le passage (voir **1.4. Culture des cellules iPS**). Puis ces colonies sont transférées en plaque 6 puits traitées avec du poly(2-hydroxyethylméthacrylate) (pHEMA, Sigma-Aldrich) pour empêcher l'adhérence (ou dans un disque Pétri de 10 cm) et cultivées en suspension avec du milieu EB, c'est-à-dire du milieu iPS sans hbFGF.

▪ Le « hanging drop »

Les colonies d'iPS sont dissociées par incubation 2 à 3 min avec 2 mL de StemPro® Accutase® (Gibco) à 37°C. La suspension cellulaire obtenue après aspiration/refoulement est numéree. Après lavage avec du milieu EB, le culot est repris avec un volume de milieu EB permettant d'obtenir une concentration de $1,5 \cdot 10^5$ cellules/mL. Des gouttes de 20 µL, contenant 3000 cellules, sont déposées à

l'intérieur d'un couvercle d'une boîte de Pétri. Celui-ci est retourné précautionneusement pour refermer la boîte de Pétri remplie avec 15 mL de PBS pour éviter le dessèchement des gouttes. Après 48h dans l'étuve à 37°C, les cellules ont sédimenté au niveau du ménisque et formé une sphère. Les gouttes contenant les cellules agrégées en corps embryoïdes sont transférées en puits d'une plaque 6 puits traités avec du PHEMA, et cultivées en milieu EB.

Pour ces deux techniques, le milieu est changé tous les 2-3 jours par transfert de la suspension dans un tube conique, sédimentation des EBs pendant 5-10 min environ, aspiration du surnageant puis ajout de milieu frais et transfert dans le puits de culture ou la boîte de Pétri d'origine.

▪ Le « spin »

Comme pour le « hanging drop », cette technique est réalisée à partir d'une suspension de cellules iPS dissociées. La concentration cellulaire est ajustée à 6.10^4 cellules/mL en milieu EB. 3000 cellules, soit 50 µL de la suspension cellulaire, sont transférées dans chaque puits d'une plaque 96 puits ultra-low attachment (Corning). La plaque est centrifugée 3 min à 500g. Tous les 3 jours, 50 µL de milieu de culture sont rajoutés dans les puits.

Les images des corps embryoïdes sont prises à l'aide d'un microscope inversé Leica DM IL équipé d'un appareil photo numérique Leica D-LUX 3.

3. Cytométrie en flux : analyse de la pluripotence

Dissociation des colonies iPS. Le culot de cellules iPS obtenu après décollement des colonies à la collagénase IV et sédimentation est incubé pendant 2-3 min avec 2 mL de StemPro® Accutase® (Gibco) à 37°C. Le culot est ensuite aspiré et refoulé avec précaution pour dissocier les agrégats et obtenir une suspension de cellules isolées. Les cellules sont lavées en tampon FACS (PBS + SVF 2 % + EDTA 2 mM + azide de sodium 0,05 % (p/v, NaN₃)). En cas de présence d'agrégats indissociables, la suspension est passée à travers un filtre 70 µm (BD Biosciences).

Protocole de marquage. Au minimum 2.10^5 cellules sont utilisées pour chaque marquage dans des microtubes de 1,5 mL. Les anticorps ainsi que le facteur de dilution utilisés sont indiqués dans le Tableau 3. Les lavages (cellules rincées avec 500 µL de solution tampon suivi d'un spin de 10 secondes en microcentrifugeuse) et les dilutions d'anticorps sont réalisés en tampon FACS (sauf mention contraire). Les anticorps sont incubés pendant 30 min dans un volume final de 100 µL, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Tableau 3. Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux et leurs conditions d'utilisation.

Anticorps			Fournisseur	Perméabilisation	Dilution
Tra-1-85	IgG ₁ souris	AF488	Millipore	Non	1/200
Oct3/4	IgG ₁ souris	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	Oui	1/10
Sox2	IgG _{2a} souris	AF647	BD Biosciences	Oui	1/10
Nanog	IgG ₁ souris	PE	BD Biosciences	Oui	1/10
SSEA-3	IgM rat	PE	BD Biosciences	Non	1/10
SSEA-4	IgG ₃ souris	FITC	BD Biosciences	Non	1/10
Tra-1-81	IgM souris	AF647	BD Biosciences	Non	1/10

- Marquage des cellules vivantes et humaines (7AAD, Tra-1-85) : les cellules sont incubées avec l'anticorps anti-Tra-1-85. Après 2 lavages, le culot est repris dans 100 µL de tampon FACS et incubé avec 4 µL de 7-amino-actinomycin D (7AAD) (BD Biosciences) pendant 10 min avant la lecture au cytomètre.

- Marquage des facteurs de transcription (Oct3/4, Sox2, Nanog) : la localisation de ces marqueurs étant intracellulaire, les cellules sont fixées avec 100 µL de Cytofix (BD Biosciences) 20 min à température ambiante. Après 2 lavages en PermWash 1X (BD Biosciences), les cellules sont perméabilisées par incubation pendant 10 min à température ambiante avec 100 µL de PermWash 1X. Puis, après spin et aspiration de la solution de perméabilisation, les cellules sont reprises dans 100 µL de PermWash 1X contenant les 3 anticorps dilués comme précisé dans le tableau. Deux rinçages sont ensuite réalisés en PermWash 1X et le culot est finalement suspendu dans 400 µL de PermWash 1X.

- Marquage des marqueurs membranaires de pluripotence (SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-81) : les cellules ne sont ni fixées, ni perméabilisées, mais directement incubées avec 100 µL de tampon FACS contenant les 3 anticorps, et selon la dilution donnée dans le tableau. Après l'incubation suivie de deux lavages, les cellules sont reprises dans 400 µL de tampon FACS.

Pour chacun des 3 tubes de marquage, un tube témoin est réalisé par incubation des cellules avec les isotypes contrôles correspondant. Ils permettent d'évaluer les interactions non spécifiques de chacun des anticorps et ainsi d'établir le seuil de marquage positif.

Analyse. Après marquage, les suspensions cellulaires sont transférées dans des tubes dédiés au cytomètre. L'analyse est réalisée au cytomètre en flux avec acquisition d'au moins 50000 évènements pour chaque marquage. Les logiciels Diva et FlowJo ont été utilisés pour le traitement des données.

4. Immunocytochimie

4.1. Pluripotence des colonies de cellules iPS

Préparation des plaques de cellules iPS. Les puits d'une plaque 12 puits sont préalablement préparés de la façon suivante : une lamelle en verre de 12 mm de diamètre stérilisée avec de l'alcool 70 % est déposée au fond de chaque puits, puis ceux-ci sont traités avec 500 µL de gélatine 0,1 % pendant au moins 3h. Les MEFs sont ensuite ajoutés à une densité de 2.10^4 cellules/cm². Le lendemain, les colonies de cellules iPS sont mises en culture sur ces MEFs pendant 3-5 jours.

Protocole de marquage. Le jour du marquage, les puits sont rincés 2 fois avec 1 mL de PBS puis incubés pendant 10 min à température ambiante avec 200 µL d'une solution de fixation de PFA 4 % (p/v) sous hotte chimique. Après 3 lavages avec du PBS, les puits sont incubés pendant 15 min à température ambiante avec 1 mL de solution de blocage (PBS, albumine bovine (BSA) 5% (p/v) et sérum de chèvre 5 % (Sigma-Aldrich)). Cette solution est également utilisée pour diluer les anticorps. Dans les puits nécessitant une perméabilisation, du Triton X100 est ajouté à une concentration de 0,25 % à la solution de blocage, et à 0,1 % pour la dilution des anticorps. La solution de blocage +/- perméabilisation est éliminée par aspiration et les puits sont incubés avec les anticorps. Les anticorps utilisés, déjà couplés à un fluorochrome, sont les mêmes que ceux décrits dans le paragraphe 3, Tableau 3. La dilution de l'anticorps Tra-1-85 est toujours de 1/200, alors que pour tous les autres marqueurs de pluripotence, la dilution utilisée est de 1/25. L'incubation avec les anticorps se fait pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière dans un volume final de 200 µL par puits. Les puits sont ensuite lavés : 2 lavages rapides à température ambiante, puis 3 lavages de 5 min dans de la glace et sous agitation. Le marquage des noyaux est réalisé par incubation des puits pendant 7 min avec 200 µL d'une solution de Hoechst diluée à 1 µg/mL à l'abri de la lumière.

Les lamelles sont ensuite décollées des puits et montées sur des lames avec du milieu de montage Dabco (Sigma-Aldrich), leur contour est ensuite verni pour éviter le dessèchement. Ces lames sont conservées dans une boîte à +4°C et à l'abri de la lumière.

Analyse. Les lames sont analysées à l'aide d'un microscope confocal TCS-SP2 (Leica) en collaboration avec Didier Grunwald (iRTSV/BCI, CEA, Grenoble), et le traitement des images se fait grâce au logiciel ImageJ (NIH, Etats-Unis).

4.2. Marqueurs des 3 lignées embryonnaires des EBs

Préparation des plaques. Les EBs obtenus par la technique de transfert des colonies sont cultivés en suspension dans une boîte de Pétri avec du milieu EB. Après 21 jours de culture en suspension, les EBs sont transférés dans des puits d'une plaque 24 puits traités avec de la gélatine 0,1 % pour permettre leur adhérence. La culture en plaque est poursuivie pendant environ 15 jours avec changement du milieu tous les 3 jours.

Protocole de marquage. Le jour du marquage, le milieu est aspiré et les puits rincés avec du PBS. Dans chaque puits, 200 μ L d'une solution de fixation de PFA 4 % est ajouté. Après 10 min d'incubation à température ambiante suivi de 2 rinçages avec du PBS, les puits sont incubés pendant 15 min à température ambiante avec 1 mL de solution de blocage/perméabilisation comme décrit précédemment. La liste des anticorps primaires et secondaires utilisés est détaillée dans le Tableau 4 ci-dessous. Tous ces anticorps sont intracellulaires et proviennent du kit Human Embryonic Germ Layer Characterization Kit (Millipore, réf SCR030), à l'exception de l'anticorps anti-CD31 (BD Biosciences) dirigé contre le marqueur membranaire CD31 à localisation membranaire et pour lequel les solutions de blocage, de lavage et de dilution ne contiennent donc pas de Triton X100.

Tableau 4. Liste des anticorps utilisés pour l'immunofluorescence et leur dilution.

	Anticorps primaire			Anticorps secondaire			
MESODERME	α SMA	IgG _{2a} souris	1/200	Anti-IgG _{2a} souris	Chèvre	AF488	1/200
	Troponin I	IgG _{2b} souris	1/200	Anti-IgG (H+L) souris	Chèvre	AF488	1/200
ECTODERME	Nestin	Lapin polyclonal	1/10000	Anti-IgG (H+L) lapin	Chèvre	AF488	1/200
	MAP-2	IgG ₁ souris	1/200	Anti-IgG (H+L) souris	Chèvre	AF488	1/200
ENDODERME	α FP	IgG _{2a} souris	1/500	Anti-IgG (H+L) souris	Chèvre	AF488	1/200
	CD31	IgG ₁ souris	1/20	Déjà couplé à la R-Phycoerythrine (PE)			

Après blocage +/- perméabilisation, chaque anticorps primaire est dilué dans volume final de 200 μ L/puits, chaque marquage étant réalisé en double. La fixation aspécifique des anticorps est

vérifiée à l'aide d'anticorps isotypiques correspondants. Après 30 min d'incubation à température ambiante, les puits sont rincés deux fois et les anticorps secondaires sont ajoutés (sauf dans les puits de marquage de CD31) dans un volume de 200 μ L/puits. Puis, après 2 lavages rapides et 3 lavages de 5 min sur de la glace, le marquage des noyaux est réalisé avec une solution de Hoechst diluée à 1 μ g/mL comme précédemment décrit.

Analyse. Les plaques sont directement observées à l'aide d'un microscope à immunofluorescence Olympus BX51 équipé d'une caméra digitale Olympus DP70. Le logiciel Cell^F (Olympus) permet l'acquisition des images et leur traitement se fait grâce au logiciel ImageJ (NIH, Etats-Unis).

5. Méthodes de biologie moléculaire

5.1. Extraction de l'ADN génomique

La purification d'ADN génomique est réalisée à l'aide du kit d'extraction A1120 (Promega).

Après culture et décollement à l'aide de la collagénase IV, les colonies d'iPS sont laissées sédimenter pour éliminer les MEFs puis lavées en PBS et centrifugées pendant 5 min à 500g. Le culot est vigoureusement vortexé puis mélangé avec 300 μ L de solution de lyse des noyaux. Après obtention d'un mélange visqueux, 1,5 μ L de solution de RNase sont ajoutés et le tout est incubé pendant 15 min à 37°C. Puis, après ajout de 100 μ L de solution de précipitation des protéines, le mélange est vortexé 10-20 secondes puis centrifugé 3 min à 12000g. Un culot brun-sombre apparaît alors. Le surnageant est ensuite transféré dans un tube type « eppendorf » contenant 300 μ L d'isopropanol et mélangé par inversion du tube jusqu'à apparition de filaments blancs se rassemblant en une pelote d'ADN. A cette étape, l'ADN peut être congelé de façon temporaire à -20°C. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol 70 % (v/v) glacé puis centrifugé. Le surnageant est aspiré et le culot laissé à sécher à l'air pendant 2h jusqu'à ce qu'il devienne transparent. Ce culot est ensuite repris par 20-30 μ L d'eau stérile pour préparation injectable, le volume ajouté étant ajusté en fonction de la taille du culot. L'ADN peut alors être congelé à -80°C et conservé plusieurs années. La mesure de la concentration en ADN se fait à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible, le Nanodrop 2000 (ThermoScientific) par mesure de l'absorbance (Densité Optique, DO) à 260 nm, le résultat est rendu en ng/ μ L. Le rapport DO 260/DO 280 permet d'évaluer la contamination de l'ADN par des protéines absorbant à 280 nm, et doit être compris entre 1,8 et 2.

5.2. Amplification de l'exon 5 de *CYBB* par PCR

Après extraction de l'ADN génomique, l'amplification de l'exon 5 du gène *CYBB* est réalisée par PCR selon la technique détaillée ci-après. Les réactifs à mélanger et leurs volumes respectifs (pour 1 PCR) sont indiqués dans le Tableau 5.

Chaque PCR s'accompagne de 2 témoins : un témoin positif (c'est-à-dire une PCR dans laquelle l'ADNg est extrait de neutrophiles purifiés à partir du sang total d'un patient témoin) et un témoin négatif (c'est-à-dire une PCR dans laquelle il y a tous les réactifs sauf l'ADNg).

Tableau 5. Mélange à réaliser pour l'amplification de l'exon 5 de *CYBB* par PCR. Volumes donnés pour 1 PCR.

	Volume	Concentration finale
Incubation Mix Taq Pol 10X	5 µL	1X
Mix dNTP 5 mM	2 µL	0,2 mM
Formamide	1 µL	2 % (v/v)
Amorce sens i4e 40 µM	0,35 µL	0,28 µL
Amorce anti-sens i5i* 40 µM	0,35 µL	0,28 µL
Eau distillée	40,05 µL	
ADNg	1 µL	
Taq Polymérase 5 U/µL	0,25 µL	25 mU/µL

Le volume final par godet est de 50 µL. Tous les godets sont mis dans le Thermocycler (C1000™ Thermal Cycler, BioRad). Après une première dénaturation à 95°C durant 3 min, le programme PCR est constitué de 35 cycles identiques se décomposant comme tels : 1 min à 95°C (dénaturation des doubles brins d'ADN), 1 min à T° d'hybridation (T°H) de 58°C, et 1,5 min à 72°C (polymérisation de l'ADN, temps d'élongation). La réaction se termine par 7 min d'élongation supplémentaire puis la réaction est stoppée par une chute de température à 10°C. A la fin de la réaction, le produit PCR peut être conservé à -20°C.

La validation du témoin positif et négatif ainsi que la taille et la spécificité des produits PCR sont contrôlées par migration électrophorétique de l'amplifiat sur gel d'agarose (voir paragraphe 5.3).

Tableau 6. Séquence des amorces de l'exon 5 de *CYBB*.

Amorces	Séquence	T°H utilisée	Taille de l'amplifiat
I4e	GTCCCAGAAACCCAGCTTACA	58°C	287 pb
I5i*	CACTGAAATCTAGTCCTCAATTG		

5.3. Migration sur gel d'agarose

Le gel d'agarose 1,5 % (p/v) est obtenu par dissolution complète de 0,6 g d'agarose ultrapure (Invitrogen) dans 40 mL de tampon TAE 0,5X stérile avec chauffage au micro-onde quelques minutes, puis ajout de 0,8 µL de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10000X (FluoProbes®). Le mélange est versé dans un petit support avec un peigne de 8 dents. Après refroidissement du gel et retrait du peigne, 4 µL de produit PCR mélangé à 1 µL de Sample Buffer 10X, ou 5 µL dans le cas du marqueur de poids moléculaire XIV (Roche), est déposé dans un puits du gel. La migration électrophorétique dure entre 40 min et 1h sous une tension de 100V.

La vérification de la migration et de l'amplification des produits de PCR se fait avec une caméra Molecular Imager GelDoc™ XR+ (Biorad) et à l'aide du logiciel Image Lab™.

5.4. Séquençage

Une fois l'expansion de l'exon 5 de *CYBB* réalisée pour toutes les lignées de cellules iPS, les produits de PCR sont envoyés à Eurofins MWG Operon (Allemagne) pour séquençage direct dans les deux sens. Les séquences reçues sont ensuite analysées par le logiciel ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

6. Caryotype

La technique du caryotype a été mise au point dans le Service de Génétique Chromosomique du CHU de Grenoble dirigé par le Dr F. Amblard et en collaboration avec les Drs V. Satre et F. Devillard.

Blocage des cellules en métaphase et étalement chromosomique (Communication personnelle du Dr F. Pellestor, Service de Génétique Médicale du CHU de Montpellier). Les cellules iPS sont cultivées en plaques 6 puits sur MEFs pendant 4 jours. Après aspiration du milieu de culture, 2 mL de milieu iPS additionné de colchicine (KaryoMAX COLCEMID, Gibco) à une concentration finale de 0,1 µg/mL sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 90 min à 37°C. La colchicine va

perturber les fuseaux mitotiques et bloquer les cellules en métaphase de la mitose. La colchicine est ensuite éliminée par aspiration et 500 µL de TrypLE sont ajoutés. Après 7-10 min d'incubation à 37°C et ajout de 2 mL de solution PBS - 2 % FBS, les cellules sont mises en suspension par aspiration/refoulement puis transférées dans un tube conique. Les cellules sont centrifugées 10 min à 1000 rpm. Un choc hypotonique est réalisé sur le culot cellulaire par ajout de 9 mL d'une solution préchauffée de KCl 0,075 M (1 mL de KCl 0,75 M + 9 mL d'eau Volvic®), 3 mL étant d'abord ajoutés goutte à goutte puis les 6 mL restant directement, tout en vortexant doucement. Cette suspension est incubée 20 min à 37°C. Ce choc provoque le gonflement et la lyse des cellules. Il est arrêté par pré-fixation des cellules avec 1 mL de solution fixatrice refroidie dans la glace. Cette solution de fixation (méthanol/acide acétique glacial 3:1 (v/v)) est ajoutée goutte à goutte avec agitation douce au vortex. Le tube est ensuite laissé 4 min dans la glace pour augmenter le nombre de mitoses collectées, puis centrifugé (10 min, 1000 rpm). Le surnageant est aspiré en laissant 500 µL pour remettre le culot en suspension par agitation douce. Les 3 étapes de fixation qui suivent sont très importantes. Pour chacune d'elle, toujours avec agitation douce au vortex, 3 mL de solution de fixation (4°C) sont ajoutés goutte à goutte suivis d'un ajout rapide de 3 mL pour la première fixation et 3 mL pour la seconde, puis centrifugation. Pour la troisième fixation, le culot est repris de la même façon dans 3 mL de solution fixatrice puis centrifugé. Pour finir, le culot est repris dans 0,5-1 mL de solution de fixation. Les cellules peuvent être laissées dans le fixateur à 4°C jusqu'à l'étalement et la coloration des bandes, ou à -20°C pour une conservation à long terme. Juste avant l'étalement, les cellules en suspension dans le fixateur sont centrifugées et le culot repris avec 0,5-1 mL de fixateur en fonction de la taille du culot cellulaire. L'étalement de la suspension cellulaire se fait ensuite sous une hotte chimique Captair'Chem dans une pièce à humidité contrôlée (45-48 %) à 25°C. 10 µL de suspension cellulaire sont déposés sur une lame en verre suivi immédiatement par l'ajout d'une goutte de fixateur pour améliorer l'étalement des chromosomes. La présence de cellules en métaphase est ensuite vérifiée par observation au microscope.

Technique des bandes R. Cette coloration classique permet l'apparition de bandes sombres et claires dont l'alternance est caractéristique d'un chromosome et permet de l'identifier. Pour obtenir un caryotype en bandes R, la chromatine est dénaturée par la chaleur. Pour cela, les lames sont d'abord hydratées 30 sec dans l'eau puis plongées dans un borel rempli de tampon sodium dihydrogénophosphate monohydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 138 g/L dilué dans de l'eau Volvic®) et avec un pH ajusté à 4,2) préchauffé au bain marie à 88,5°C. Cette dénaturation dure 20-40 min à 88,5°C. Puis les lames sont rapidement rincées à l'eau et colorées 3 min au Giemsa à 3 %. Elles sont ensuite de nouveau rincées, puis séchées et protégées par une lamelle fixée avec de l'EUKITT.

Analyse des caryotypes. Les lames sont observées avec un microscopique optique (Zeiss) à l'objectif 100 à immersion couplé à un analyseur d'images. Les mitoses les mieux étalées (chromosomes dispersés mais restant à l'intérieur d'une surface circulaire) sont saisies et caryotypées à l'aide du logiciel MetaSystems Ikaros®. Pour chaque lignée cellulaire iPS, 30 métaphases sont examinées.

RESULTATS

1. Reprogrammation des fibroblastes en cellules iPS

Les fibroblastes issus d'une biopsie de peau d'un témoin et d'un patient atteint de CGDX ont été reprogrammés en cellules souches pluripotentes induites (iPS) par l'équipe du Dr Tomo Saric à l'Institute for Neurophysiology à Cologne (Allemagne). Ils ont utilisé une méthode de reprogrammation par transduction rétrovirale des 4 facteurs de transcription humains Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc. Deux clones pour chaque lignée de cellules iPS ont été sélectionnés après reprogrammation et amplifiés. Leur identification « cellules iPS » a été réalisée à passages précoces (p6-8) selon des critères morphologiques mais également par coloration à la phosphatase alcaline (marqueur des cellules souches) (Figure 19) ainsi que l'analyse en immunofluorescence et cytométrie en flux de l'expression de différents marqueurs de pluripotence.

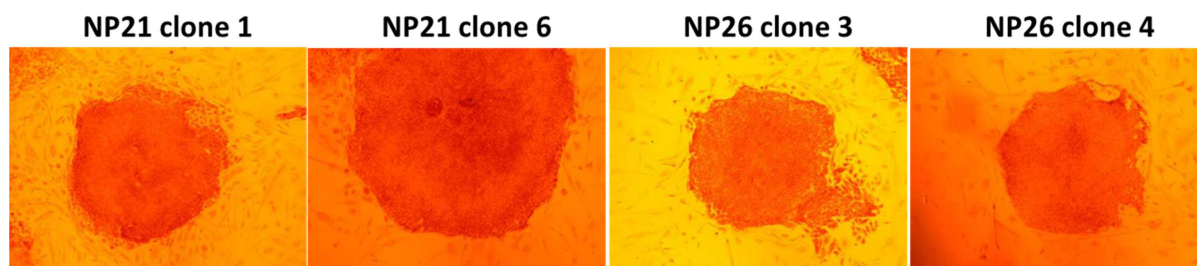


Figure 19. Marquage de l'activité phosphatase alcaline des colonies iPS pour les 4 clones. Le marquage a été réalisé par l'équipe du Dr T. Saric sur des colonies à passage 6. Grossissement x4.

Les quatre clones (NP21 clones 1 et 6 pour la lignée iPS CGDX, et NP26 clones 3 et 4 pour la lignée iPS témoin) nous ont été transmis à passage 20.

2. Mise en place de la culture des cellules iPS

Nous avons testé deux méthodes de culture pour amplifier les cellules iPS et les maintenir dans un état indifférencié. La première méthode repose sur l'utilisation de cellules nourricières, des fibroblastes embryonnaires murins MEFs. Ceux-ci ont été inactivés par traitement par de la mitomycine C ou irradiation gamma (dose délivrée totale de 50 Gy). Pour la seconde méthode, les cellules iPS sont cultivées sur une matrice extracellulaire (MEC). Deux types de matrices ont été comparés : le MatrigelTM et la Vitronectine XFTM. L'efficacité de ces méthodes a été analysée dans un premier temps par la morphologie des cellules iPS cultivées dans des plaques 6 puits (Figure 20).

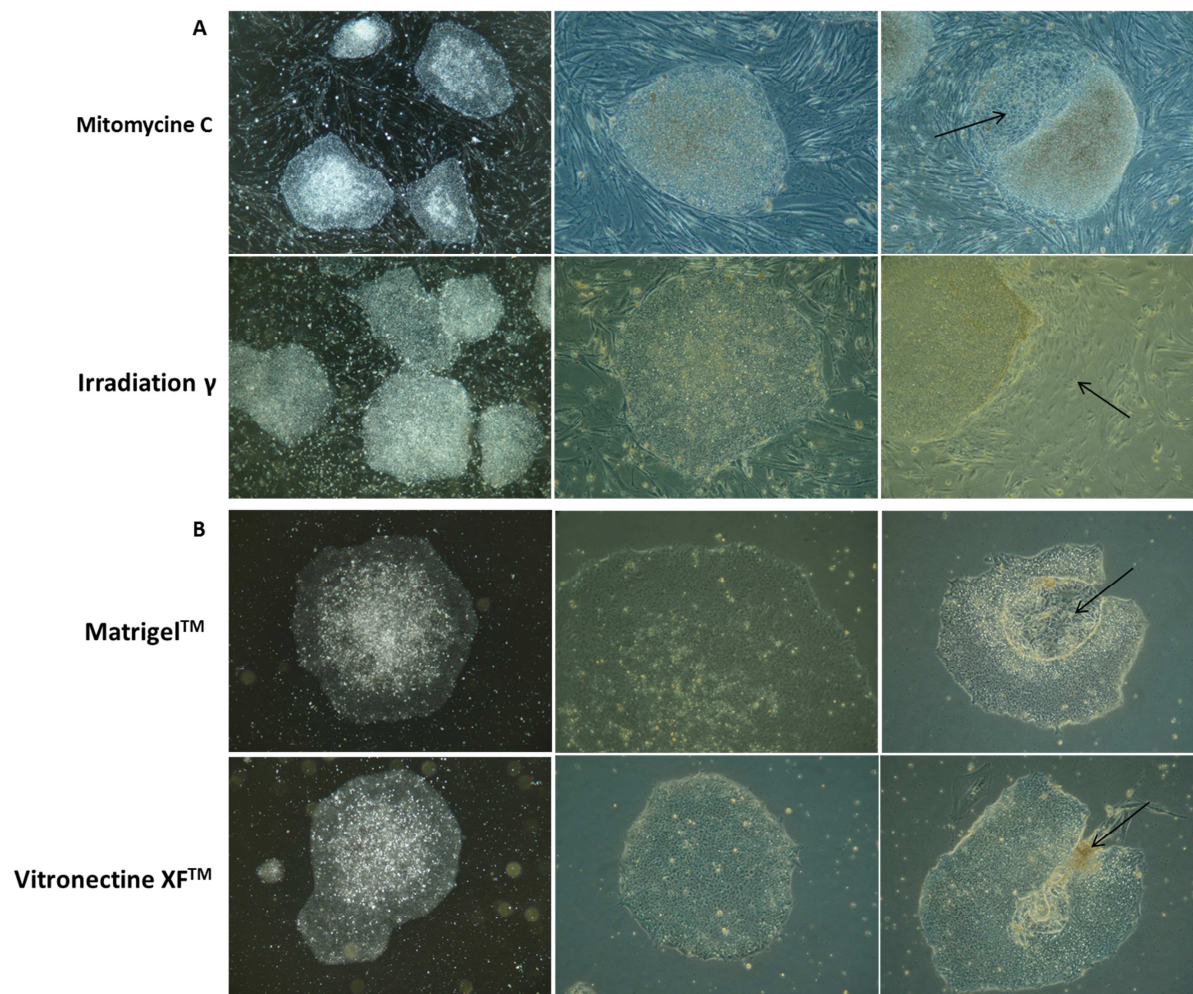


Figure 20. Culture des cellules iPS sur cellules nourricières MEFs (A) inactivées par la mitomycine C ou irradiation γ , et sur matrice extracellulaire (B) Matrigel™ ou Vitronectine XF™. Les photos de gauche sont prises au grossissement x4, celles du milieu et de droite au grossissement x10. Les zones de différenciation sur les photos de droite sont indiquées par des flèches.

Toutes ces méthodes sont capables de maintenir les cellules iPS dans un état indifférencié (Figure 20). Concernant la technique d'inactivation des MEFs, aucune différence n'a pu être observée entre l'irradiation gamma ou le traitement par mitomycine C (Figure 20A).

Les colonies iPS sont de forme ovoïde, compactes, avec des bords bien distincts et une forme légèrement bombée. Elles sont composées de cellules avec un ratio noyau/cytoplasme (N/C) élevé et un large nucléole (Figure 21).

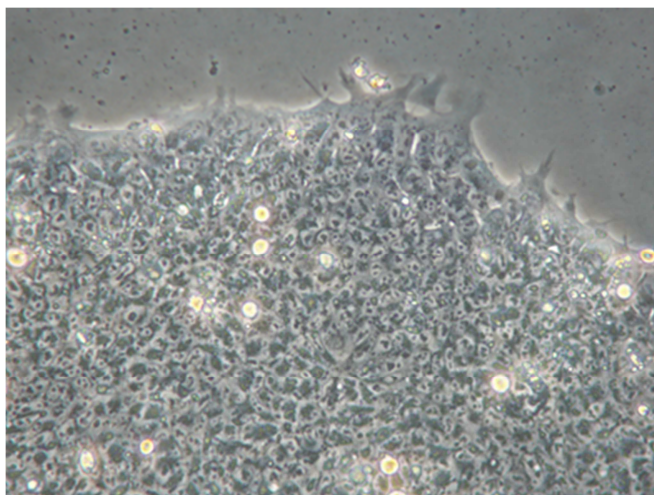


Figure 21. Agrandissement d'une colonie de cellules iPS cultivées sur Matrigel™. Grossissement x20.

Cependant, des zones de différenciation spontanées visibles au microscope ont pu être observées, et cela, quelle que soit la méthode de culture (Figure 20). Lorsque ce phénomène de différenciation est trop important, c'est-à-dire touchant plus de 20-30 % des colonies, les puits de culture doivent être éliminés. Un changement régulier du milieu de culture ainsi qu'une surveillance continue de l'aspect des colonies est donc nécessaire afin de détecter les premiers signes de différenciation spontanée. Cela conditionne généralement le jour de passage des cellules qui doit se faire lorsque les colonies ont atteint une taille suffisante, mais avant toute apparition de différenciation.

Le comportement en culture n'est pas identique pour toutes les lignées de cellules iPS. La lignée NP26 clone 3 a tendance à se différencier très rapidement et nécessite donc des passages rapprochés, c'est-à-dire tous les 4 jours, les autres lignées autorisant des passages tous les 5-6 jours.

Pour la culture sur MEC, aucune colonie n'a pu être obtenue après décongélation et mise en culture directement sur Matrigel™ et Vitronectine XF™, et cela à deux reprises et avec 2 clones différents. Seules des colonies cultivées sur MEFs, décollées et transférées sur MEC ont pu adhérer et proliférer.

Pour des raisons qui seront développées dans la discussion, et bien que toutes ces méthodes soient comparables pour maintenir la pluripotence, les cellules iPS sont cultivées sur des MEFs inactivés par irradiation gamma.

3. Vérifier la pluripotence des cellules iPS

3.1. Expression des facteurs de transcription et marqueurs de pluripotence

L'observation seule de la morphologie des colonies au microscope, même si utile lors de l'utilisation en routine des cellules iPS, n'est pas suffisante pour prouver leur pluripotence. Celle-ci doit être objectivée régulièrement en cours de culture par la présence de marqueurs de surface reliés à l'état de pluripotence et/ou par l'expression de facteurs de transcription (et notamment certains de ceux utilisés pour la reprogrammation des fibroblastes en cellules iPS). Cette expression a été observée à la fois par immunofluorescence et cytométrie en flux.

Les cellules iPS étant cultivées en coculture avec des cellules MEFs, d'origine murine, il est nécessaire de vérifier que l'analyse par cytométrie en flux de l'expression des différents marqueurs n'est réalisée que sur les cellules iPS. Pour cela, l'anticorps Tra-1-85 a été utilisé. Il reconnaît un antigène de surface exprimé par tous les types cellulaires humains : l'antigène Ok^a du système de groupe sanguin humain OK.

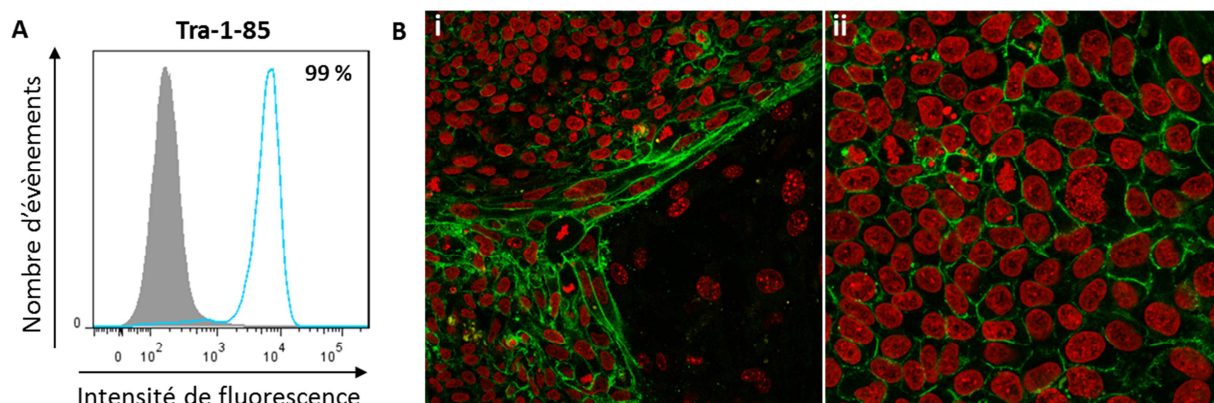


Figure 22. Expression de Tra-1-85 par les cellules iPS en culture sur des MEFs. A) Analyse par cytométrie en flux. La courbe grise correspond à l'isotype contrôle correspondant. B) Analyse par immunofluorescence des colonies iPS en coculture avec des MEFs, i- zone de contact entre 2 colonies, grossissement x20 et ii- intérieur d'une colonie, grossissement x40. L'anticorps anti-Tra-1-85 est couplé à l'AlexaFluor® 488 visible en vert, et les noyaux sont colorés par du Hoechst (rouge).

Les résultats présentés sur la Figure 22A montrent que la population cellulaire analysée par cytométrie en flux est à plus de 99 % d'origine humaine. Les pourcentages d'expression des différents marqueurs de pluripotence présentés plus loin sont donc uniquement mesurés sur les cellules iPS, sans contamination par des MEFs (< 2%). De plus, l'analyse par immunofluorescence

confirme la spécificité de ce marquage : le marquage par l'anticorps anti-Tra-1-85 est localisé au niveau de la membrane des cellules iPS des colonies alors que les MEFs sont négatives (Figure 22).

3.1.1. Analyse par immunofluorescence

La pluripotence des cellules iPS en culture sur des cellules nourricières MEFs a tout d'abord été observée par immunofluorescence. Cette technique a été mise au point sur la lignée NP26 clone 3 et les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 23.

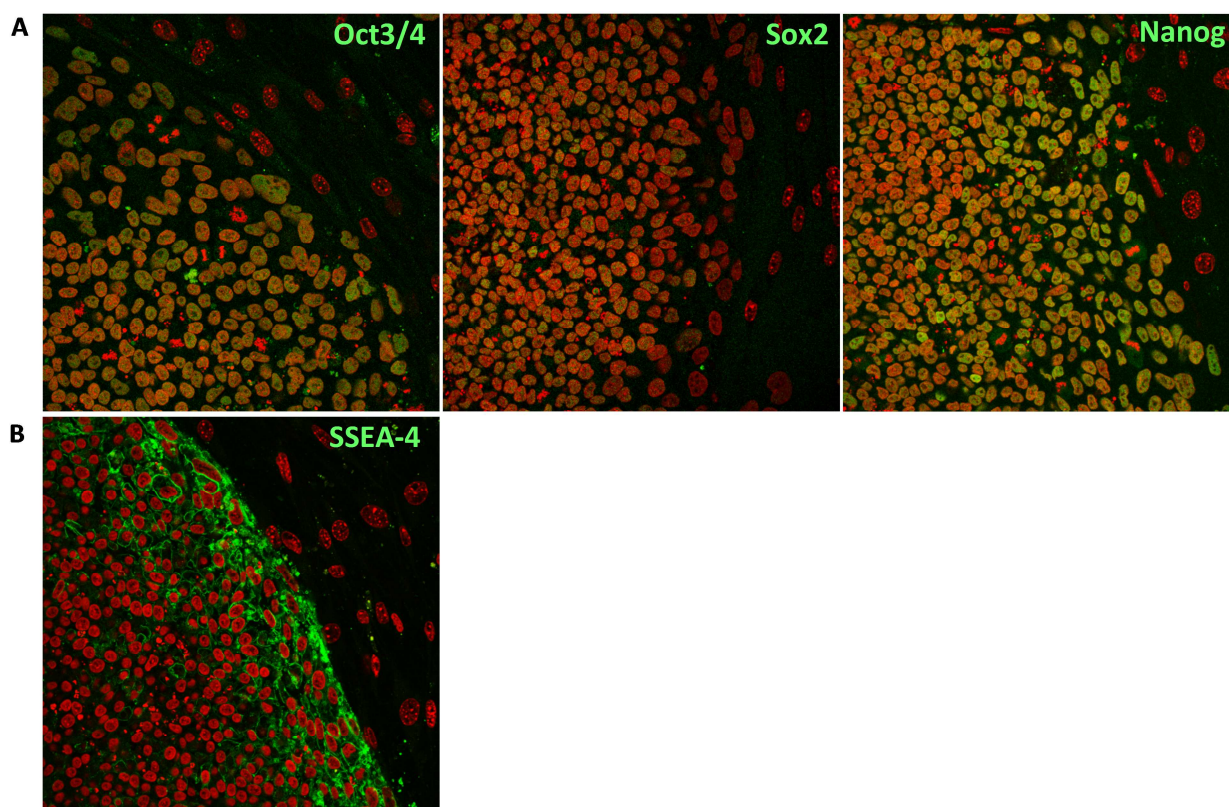


Figure 23. Expression des marqueurs de pluripotence par immunofluorescence sur des colonies iPS NP26 clone 3 (passage 23) en culture sur des MEFs. A) Facteurs de transcription Oct3/4, Sox2 et Nanog à localisation nucléaire (vert). B) Marqueur de surface SSEA-4 (vert). Grossissement x20. Les noyaux sont marqués avec du Hoechst (rouge).

Les colonies iPS NP26 clone 3 expriment les trois facteurs de transcription Oct3/4, Sox2 et Nanog au niveau nucléaire (Figure 23A) ainsi que le marqueur de surface SSEA-4 (Figure 23B). Le marquage réalisé sur les trois autres clones a donné des résultats similaires.

3.1.2. Analyse par cytométrie en flux

Le taux d'expression des facteurs de transcription (Oct3/4, Sox2 et Nanog) et des marqueurs de surface (SSEA-3, SSEA-4 et TRA-1-81) a été mesuré par cytométrie en flux pour chacune des lignées d'iPS.

La Figure 24 montre les résultats obtenus pour la lignée iPS NP26 clone 3 au passage 22, soit 2 passages après la mise en culture des cellules iPS dans notre laboratoire. Tous les marqueurs de pluripotence à l'exception de SSEA-3 sont exprimés à plus de 80 % des cellules iPS.

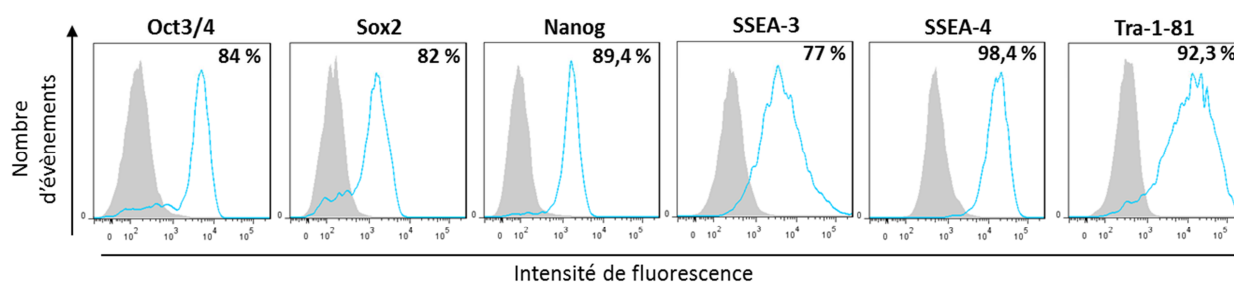


Figure 24. Analyse par cytométrie en flux de l'expression des facteurs de transcription (Oct3/4, Sox2, Nanog) et des marqueurs de pluripotence (SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-81) par la lignée iPS NP26 clone 3 au passage 22. La courbe grise correspond à l'isotype contrôle.

Les quatre lignées de cellules iPS ont été comparées pour l'expression de ces différents marqueurs (Figure 25).

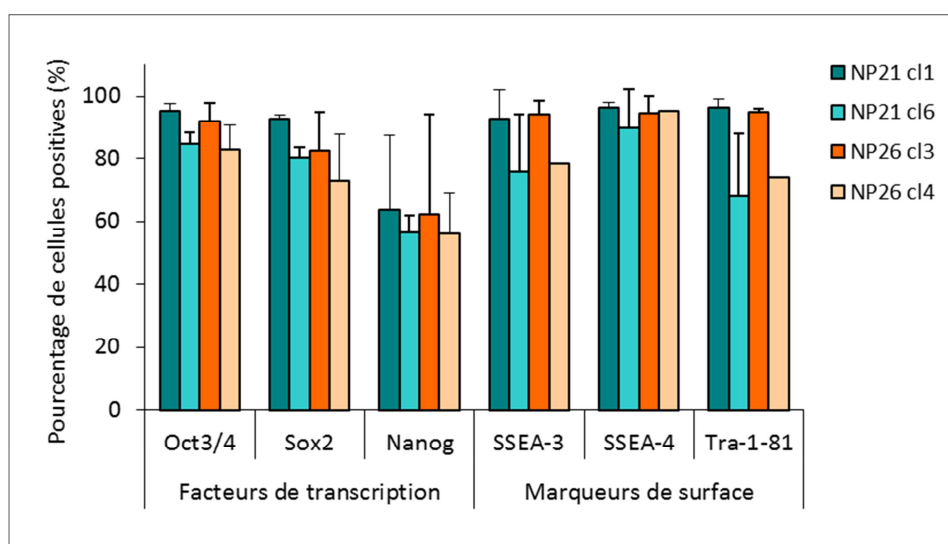


Figure 25. Comparaison de l'expression des marqueurs de pluripotence par les 4 clones de cellules iPS. n=2 pour les iPS NP21 clone 1 et NP26 clone 4, n=3 pour les iPS NP21 clone 6 et NP26 clone 3. Les barres verticales sur chaque histogramme représentent l'écart-type.

Pour chaque marqueur, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différents clones. On remarque que le facteur de transcription Nanog est exprimé de façon beaucoup plus réduite (environ 50-60 % de cellules positives), et cela pour les 4 clones testés, et à différents temps de culture.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux confirment ceux obtenus en immunofluorescence et permettent de quantifier l'expression des différents marqueurs de pluripotence. Cette première caractérisation des cellules iPS confirme bien leur statut pluripotent par l'expression des marqueurs spécifiques de cet état.

3.2. Les corps embryoides

Une manière complémentaire de prouver la pluripotence *in vitro* est la formation de corps embryoides (EB) à partir de ces cellules iPS, et leur différenciation spontanée après retrait des facteurs d'anti-différenciation (cellules nourricières MEFs et facteur de croissance hbFGF).




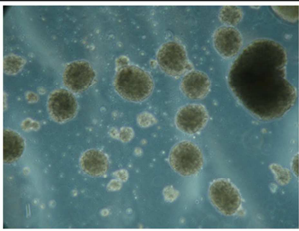
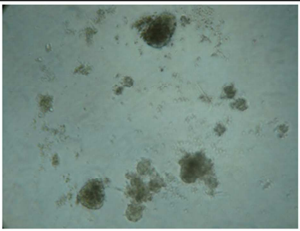
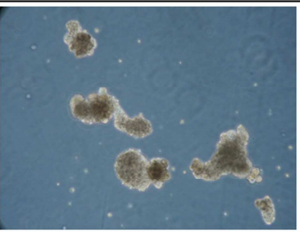
3.2.1. Choix de la technique de formation des corps embryoides

Les premières expériences réalisées avec la technique de formation des EB par transfert de colonies a permis de montrer que de bons résultats étaient obtenus avec le même milieu que celui utilisé pour la culture des cellules iPS mais sans hbFGF (résultats non montrés).

Puis différentes techniques de formation des EB issues de la littérature ont été comparées : la culture en suspension liquide en boîte de Pétri, la technique de « spin » en plaque 96 puits spécifiquement conçues pour empêcher l'adhérence, et la technique de la goutte ou « hanging drop ».

Les résultats obtenus avec ces différentes méthodes ont été comparés 2 jours après la formation des EB et sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7. Les différentes méthodes de formation des corps embryoïdes, leurs avantages et inconvénients.

Technique	Suspension liquide	Spin	Hanging drop
Principe (schéma)			
Support de culture	Plaque 6 puits (+ coating PHEMA)	Plaque 96 puits Corning low attachment	Couvercle boîte Petri puis transfert en plaque 6 puits (+ coating PHEMA)
Quantité de cellules / EB	inconnue	3000 cellules	3000 cellules
Photo à J2 (x10)			
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Technique rapide - Bon rendement 	<ul style="list-style-type: none"> - Technique relativement facile à mettre en œuvre 	<ul style="list-style-type: none"> - Homogénéité de taille ?
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Hétérogénéité de taille (variabilité de la taille des colonies iPS d'origine + phénomène d'agrégation) 	<ul style="list-style-type: none"> - Rendement moyen - Taille non homogène - Formation de plusieurs EB par puits - Coût 	<ul style="list-style-type: none"> - Technique très longue - Rendement faible

En tenant compte des avantages et des inconvénients de chacune de ces techniques, et en considérant notre objectif, nous avons choisi la technique de formation des EB par transfert des colonies en suspension liquide. Celle-ci nous permet d'obtenir très simplement et rapidement une grande quantité de corps embryoïdes, et cela, de façon assez reproductible. L'analyse qui suit a ainsi été réalisée sur des EB formés par cette méthode.

3.2.2. Les 3 lignées embryonnaires

Prouver la pluripotence *in vitro* des cellules iPS repose sur la différenciation spontanée des corps embryoïdes vers des types cellulaires dérivés des trois lignées embryonnaires : endoderme, mésoderme et ectoderme.

Pour cela, les corps embryoïdes ont été formés selon la technique de culture en suspension liquide et cultivés pendant 21 jours en boîte de Pétri. Ils ont ensuite été transférés et cultivés pendant 14 jours en condition adhérente pour faciliter la différenciation. Après adhésion des corps

embryoïdes, les cellules vont en effet changer de morphologie et parfois former des structures particulières auxquelles sont associées des expressions de marqueurs de différenciation spécifiques (Figure 26).

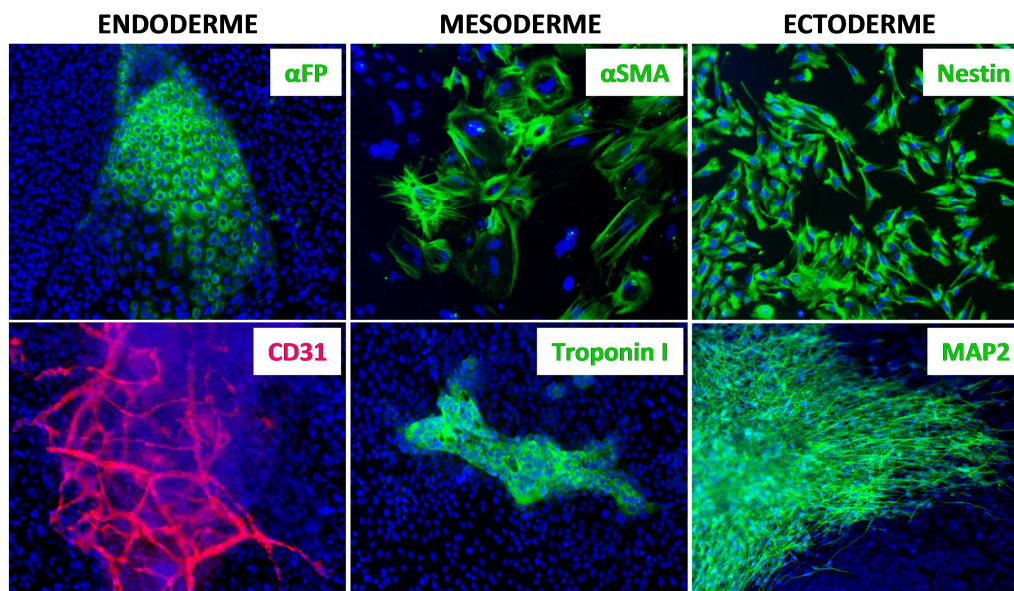


Figure 26. Immunofluorescence montrant la différenciation *in vitro* des corps embryoïdes vers les types cellulaires issus des 3 lignées embryonnaires : endoderme (α FP et CD31), mésoderme (α SMA et Troponin I) et ectoderme (Nestine et MAP2). Les anticorps secondaires sont couplés à l’AlexaFluor® 488 (vert) sauf le CD31 directement couplé à la R-Phycoérythrine (rouge). Les noyaux sont colorés avec du Hoechst (bleu). Grossissement x10.

35 jours après la formation des corps embryoïdes, des cellules différenciées dans l’un des 3 lignages ont pu être observées. Des cellules exprimant des marqueurs spécifiques de l’endoderme (α FP, *alpha-foetoprotein*, et CD31), du mésoderme (α SMA, *alpha-smooth muscle actin*, et Troponine I) et de l’ectoderme (MAP2, *microtubule-associated protein 2*, et Nestine) ont été mises en évidence par immunofluorescence (Figure 26).

De plus, en se différenciant, certaines cellules vont présenter une organisation particulière. Par exemple, les cellules exprimant le marqueur CD31 endothélial s’organisent en réseau alors que celles exprimant l’ α FP ou la troponine I cardiaque forment des foyers bien délimités. De même, des cellules positives pour MAP2, une protéine du cytosquelette spécifique des neurones, ont pu être retrouvées sous la forme d’amas cellulaire. Aucune organisation spécifique n’a pu être observée pour les cellules exprimant l’ α SMA ou Nestine.

En conclusion, la technique de formation choisie est très efficace et a permis de confirmer la capacité de pluripotence des cellules iPS par différenciation des corps embryoides vers les trois lignées embryonnaires.

4. Stabilité chromosomique des lignées iPS

Le caryotype est le test classiquement réalisé pour dépister d'éventuelles aberrations chromosomiques (anomalies de nombre ou de structure) présentes dans les cellules iPS à l'issue de la reprogrammation ou apparues en cours de culture.

Un protocole validé pour le caryotype sur sang total a été utilisé pour réaliser les premiers essais de caryotypage des cellules iPS. Cependant, les métaphases étaient peu nombreuses et ininterprétables (Figure 27).

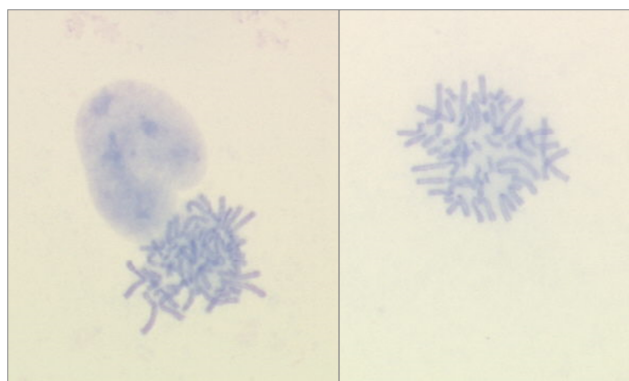


Figure 27. Métaphases obtenues à partir de la procédure de préparation des chromosomes sur cellules issues du sang. Coloration au Giemsa, grossissement x 10.

Nous avons optimisé notre protocole en modifiant certaines étapes clés telles que la préparation des cellules iPS, le temps d'incubation avec la colchicine (poison du fuseau mitotique) et l'étape de fixation (la plus importante). Des métaphases interprétables ont finalement pu être obtenues et la coloration en bandes R a été réalisée. La Figure 28 montre le caryotype obtenu pour la lignée NP26 clone 4 au passage 26.

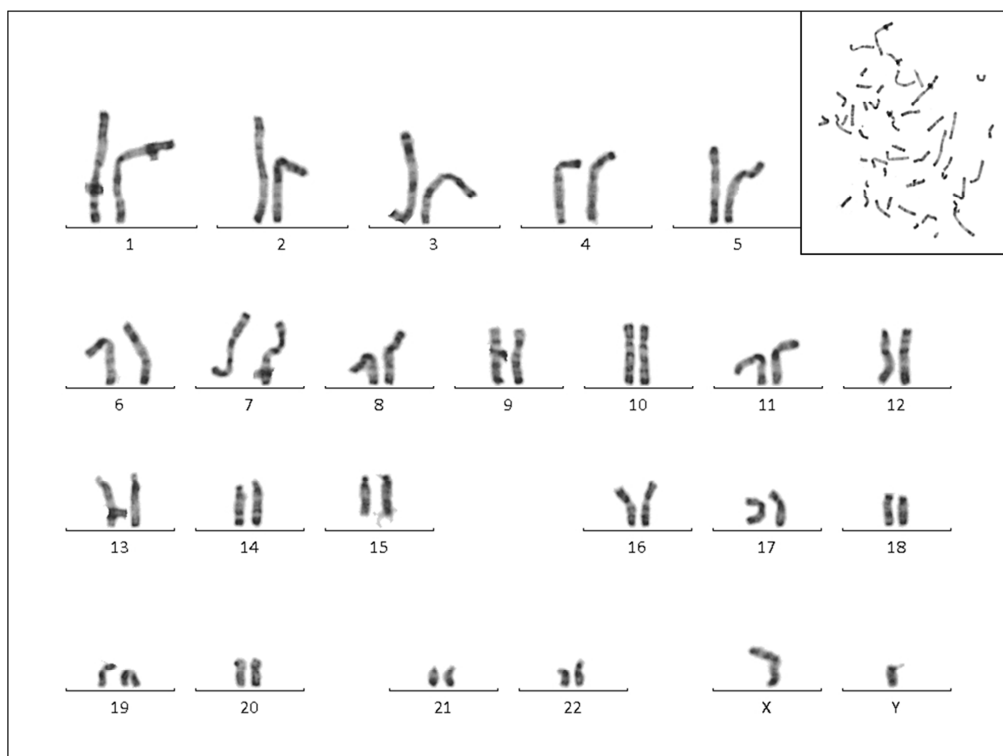


Figure 28. Caryotype réalisé sur la lignée NP26 clone 4 au passage 26. L'encart en haut à droite représente l'image des chromosomes observée après l'étalement (métaphase) et la coloration en bandes R.

Sur les 5 métaphases analysées, aucune anomalie de nombre ou de structure n'a pu être détectée. Le caryotype a confirmé que les fibroblastes avaient bien été prélevés sur un patient de sexe masculin (46,XY).

5. Modélisation de la mutation génétique

La lignée iPS NP21 (clones 1 et 6) est issue de fibroblastes prélevés chez un patient atteint de granulomatose septique liée à l'X (CGDX) dont le diagnostic fonctionnel, biochimique et génétique avait été réalisé dans notre laboratoire sur des neutrophiles isolés à partir de sang total. La mutation responsable est localisée sur le chromosome X, au niveau de l'exon 5 du gène *CYBB* codant pour la sous-unité gp91^{phox} de l'enzyme NADPH oxydase (81).

L'ADN génomique a été extrait pour chacun des clones des lignées NP21 et NP26 et l'exon 5 de *CYBB* a été amplifié par PCR à l'aide de primers spécifiques. La taille des fragments amplifiés a été contrôlée par migration sur gel d'agarose 0,8 %. Pour chaque clone, un fragment de 287 pb (taille attendue pour l'amplification de l'exon 5 de *CYBB*) a été détecté (Figure 29).

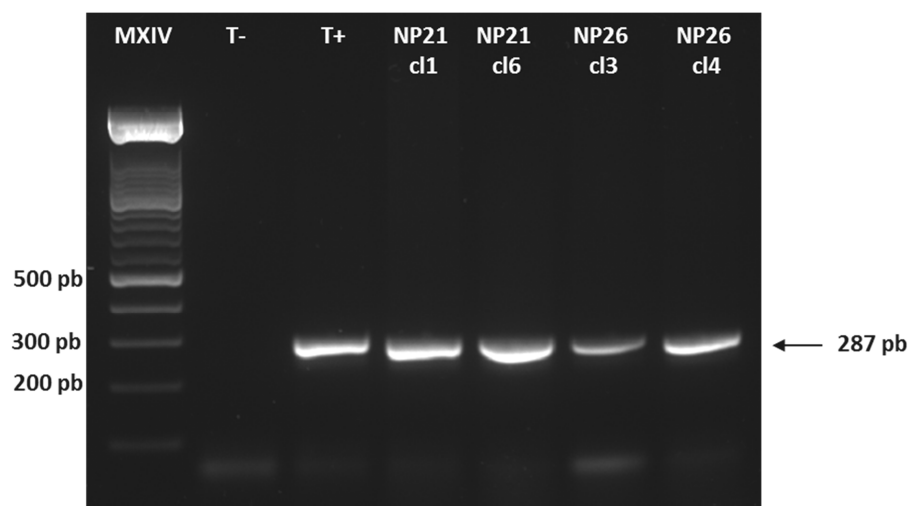


Figure 29. Contrôle de l'amplification de l'exon 5 de *CYBB* sur les 4 clones de cellules iPS sur gel d'agarose 0,8 %. Les 4 clones de cellules iPS ont été analysés en même temps qu'un témoin négatif (pas d'ADNg) et un contrôle positif (ADNg de neutrophiles de témoin sain).

Le séquençage de ces produits de PCR a confirmé la présence de la mutation non-sens c.469C>T conduisant à un codon stop TGA (Figure 30) conduisant à l'absence de la protéine NOX2 chez ce patient (p.Arg157X).

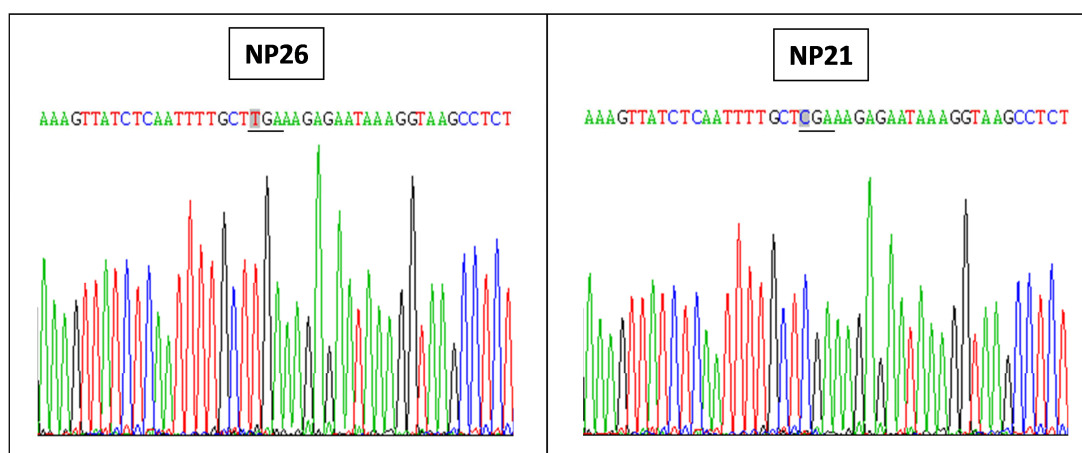


Figure 30. Séquençage de l'exon 5 de *CYBB* chez les lignées iPS NP26 et NP21. Le triplet sauvage (lignée NP26) et muté (lignée NP21) a été souligné et la base surlignée en gris.

DISCUSSION / PERSPECTIVES

DISCUSSION

La Granulomatose septique chronique (CGD) est une maladie immunitaire génétique rare causée par des mutations dans l'un des 5 gènes codant pour l'enzyme NADPH oxydase impliquée dans la production de dérivés toxiques de l'oxygène (ROS) microbicides par les cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages notamment). Dans cette pathologie, un seul traitement curatif est disponible, la transplantation de moelle osseuse allogénique. Cependant, tous les patients ne peuvent bénéficier de cette thérapeutique. Développer de nouvelles approches de thérapie est donc essentielle pour ces patients. Or, les modèles cellulaires qui pourraient permettre de réaliser les essais de thérapie *in vitro* sont imparfaits. Depuis 2006, une nouvelle technologie basée sur l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (iPS) à partir de cellules différenciées a apporté un nouvel espoir pour les maladies rares qui ne possédaient pas de modèles cellulaires physiopathologiques. Ces cellules iPS possèdent une capacité d'auto-renouvellement à l'infini en culture et sont pluripotentes, comme les cellules souches embryonnaires. Elles présentent cependant l'avantage de n'avoir aucune contrainte éthique limitant leur utilisation. De plus, elles sont spécifiques du donneur et conservent donc les anomalies génétiques dont il est porteur.

Notre projet repose ainsi sur l'utilisation des cellules iPS pour modéliser *in vitro* la CGDX, forme la plus courante de CGD et représentant environ 2/3 des cas. Lorsque nous avons débuté ce travail, il existait trois articles publiés sur la modélisation physiopathologique de la CGD grâce aux cellules iPS. Deux de ces articles ont produit des neutrophiles CGDX murins (487) et humains (488). La troisième équipe a généré des macrophages humains CGDX et CGDAR47 (489). Toutes ont montré que les cellules phagocytaires produites étaient matures et que celles issues des lignées CGDX ou CGDAR47 étaient incapables de produire des ROS, ce phénotype est identique à celui des neutrophiles et macrophages humains des patients atteints de CGD.

Le travail présenté dans cette Thèse est la première partie de la modélisation de la maladie, c'est-à-dire l'obtention des cellules iPS à partir de fibroblastes d'un patient atteint de CGDX, et leur caractérisation phénotypique et fonctionnelle. La seconde partie de la modélisation, c'est-à-dire la différenciation des cellules iPS en cellules phagocytaires, fera l'objet d'un travail rapporté dans ma Thèse de Science. Pour cela, une biopsie de peau d'un patient a été prélevée par le Dr Brion dans le Service de Médecine Infectieuse du CHU de Grenoble et les fibroblastes ont été isolés au laboratoire par culture cellulaire. La reprogrammation en cellules iPS a été réalisée par l'équipe du Dr Tomo Saric (Cologne, Allemagne). Cette équipe, spécialisée dans la reprogrammation, a utilisé une méthode rétrovirale pour transfecter les 4 facteurs de transcription Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc (OSKM). Ce

cocktail de reprogrammation appelé « cocktail Yamanaka » est très efficace et donc largement utilisé. C'est d'ailleurs la technique qui a été utilisée par l'équipe de Mukherjee *et al.* pour obtenir des cellules iPS à partir de fibroblastes de souris modèle CGDX (487) et par l'équipe de Zou *et al.* à partir de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse d'un patient mâle adulte CGDX (488). L'équipe de Jiang *et al.* a reprogrammé les fibroblastes issus de biopsies cutanées de patients à l'aide d'un seul lentivirus polycistronique codant pour les quatre facteurs OSKM (cela leur a permis d'obtenir moins de « fausses » colonies iPS partiellement reprogrammées) (489). A noter que tous ces protocoles, ainsi que le nôtre, ont utilisé un cocktail de reprogrammation contenant c-Myc ainsi qu'une stratégie de reprogrammation utilisant des vecteurs intégratifs. Or, comme discuté dans l'Introduction (Chapitre 2, paragraphe 3.3. Les vecteurs utilisés), la présence de c-Myc dans le cocktail associée à l'utilisation d'un rétrovirus induisent un risque de mutagenèse d'insertion, de transactivation d'oncogènes et de réactivation du transgène c-Myc. Cependant, le but de notre projet étant la modélisation physiopathologique et non la thérapie cellulaire, l'utilisation de cette méthode de reprogrammation n'est pas limitante. Grâce à l'évolution des techniques développées dans le laboratoire du Dr T. Saric, la reprogrammation des cellules iPS des autres formes génétiques de la CGD (CGDAR47 et CGDAR22) sont en cours de réalisation avec la technologie de vectorisation plasmidique épisomale.

Comme dans ces trois articles, notre lignée iPS « contrôle » provient d'un sujet sain. Cependant, la lignée iPS « contrôle » la plus pertinente serait la lignée CGDX que nous possédons dans laquelle la mutation génique aurait été corrigée par une technologie de type ZFN ou TALEN (494). Les deux lignées seraient alors uniquement distinguables par le statut muté ou corrigé du gène et leur capacité de différenciation serait, théoriquement, identique.

L'objectif de cette première partie du projet a été de mettre en place la culture des cellules iPS et de contrôler leur pluripotence.

La méthode classique pour maintenir les cellules iPS est la coculture sur cellules nourricières, notamment les MEFs (235). De plus, elle est couramment utilisée dans le laboratoire du Pr KH. Krause à Genève dans lequel j'ai pu me former. Nous avons donc initié la culture des cellules iPS par cette technique. Cependant, il est nécessaire d'inactiver les MEFs pour qu'ils ne puissent pas se multiplier. Deux techniques classiques sont généralement utilisées : l'irradiation aux rayons gamma ou le traitement par mitomycine C (344). Les rayonnements gamma émis par le Césium 137 produisent des cassures double-brin de l'ADN alors que la mitomycine C est un agent de chimiothérapie induisant des pontages inter-brins de l'ADN. Les deux techniques ont été utilisées au

laboratoire et nous n'avons pas observé de différence pour la culture des cellules iPS. Cependant, l'inactivation par la mitomycine C est coûteuse, assez longue (durée de 2,5-3 h) et nécessite une élimination particulière de tous les produits dans des poubelles dédiées. Au contraire, l'irradiation gamma est réalisée en moins de 10 min pour une dose délivrée de 50 Gy. Nous avons donc préféré inhiber la division cellulaire des MEFs par irradiation gamma, comme le fait également l'équipe de Jiang *et al.* qui produit les macrophages humains (489). Zou *et al.* a également utilisé des cellules nourricières d'origine murine (488) alors que l'équipe de Mukherjee *et al.* a réalisé la culture des cellules iPS sur un support recouvert de gélatine (487). Notre technique de culture est donc tout à fait pertinente pour l'utilisation que nous voulons faire des cellules iPS. Cependant, nous avons observé une variabilité de certains lots de MEFs à maintenir la pluripotence des cellules iPS, phénomène déjà décrit dans la littérature (367). Nous avons donc essayé des méthodes de culture sans cellules nourricières. Deux types de matrices extracellulaires ont ainsi été testés : le Matrigel™ et la Vitronectine XF™ en association avec le milieu mTeSR™-E8™ (StemCell™ Technologies) (345). Ces supports nous ont également permis de cultiver les cellules iPS dans un état indifférencié. La maîtrise de cette technique est par contre plus délicate que l'utilisation de MEFs et, malgré leur efficacité, l'utilisation de tels supports pour la culture en routine est extrêmement coûteuse. Ils sont généralement employés par les équipes souhaitant s'affranchir de l'utilisation de cellules nourricières, voire de sérum, et surtout en vue d'applications thérapeutiques. Nous avons donc finalement privilégié la culture sur MEFs inactivées par irradiation gamma en vérifiant, pour chaque nouveau lot de cellules nourricières, leur capacité à maintenir la croissance des cellules iPS dans un état indifférencié afin de s'affranchir de la variabilité des lots de MEFs. Ainsi, les résultats discutés par la suite sont ceux issus de cellules iPS cultivées dans ces conditions.

Les cellules souches pluripotentes sont caractérisées par leur prolifération illimitée en culture tout en conservant leur pluripotence. Nos lignées de cellules iPS cultivées sur MEFs (ou matrices extracellulaires) possèdent la morphologie caractéristique des cellules souches. Concernant l'auto-renouvellement illimité, nous n'avons pu cultiver la lignée iPS NP26 clone 3 que jusqu'au passage 37 et les autres clones que jusqu'aux passages 28-32, mais aucune modification de leur morphologie ou de leur pluripotence n'a été détectée. Aucun des trois articles de modélisation de la CGD ne précise le passage des cellules iPS auquel ont été réalisés les différents tests de pluripotence.

Démontrer la pluripotence des cellules iPS est une des étapes indispensables à vérifier avant leur utilisation. L'analyse de la pluripotence des cellules iPS est habituellement réalisée par la mise en évidence de l'expression des facteurs de transcription nucléaires et des marqueurs membranaires de pluripotence et ce, soit par cytométrie de flux, soit par immunofluorescence. Par microscopie à

fluorescence, nous avons montré l'expression nucléaire d'Oct3/4, Sox2 et Nanog, et l'expression membranaire de SSEA-4 dans nos lignées iPS (Figure 23). L'immunofluorescence a été réalisée en début de culture pour chacun des clones, puis, elle a été complétée par une analyse par cytométrie en flux (Figure 24). Plus objective et quantifiable, la cytométrie nous permet un suivi en routine tout au long de la culture et une comparaison entre les différentes lignées (Figure 25). Nous avons obtenu des résultats comparables avec ces deux techniques et la cytométrie de flux nous a permis d'analyser deux marqueurs supplémentaires, SSEA-3 et Tra-1-81, également des marqueurs membranaires de pluripotence. Cependant, l'expression de Nanog par cytométrie de flux semble plus faible par rapport aux autres marqueurs (Figure 25) alors qu'il est assez sensible en immunofluorescence. Les analyses de cytométrie ayant été réalisées plus tardivement, il est possible que l'anticorps dirigé contre le facteur Nanog se soit dégradé. L'autre hypothèse pouvant expliquer ce faible taux d'expression est qu'une très légère différenciation de nos cellules iPS serait immédiatement mise en évidence par la diminution particulièrement sensible de ce marquage. Aucune des trois équipes n'a montré d'analyse de ces différents marqueurs par cytométrie en flux alors qu'elle permet de mieux évaluer la qualité globale des cellules iPS en culture. Seuls les résultats de l'analyse par immunofluorescence sont présentés dans ces 3 articles. L'équipe de Mukherjee *et al.* est celle qui a analysé le plus de marqueurs (Sox2, Oct4, Klf4, Nanog, c-Myc ainsi que SSEA-1, marqueur des iPS d'origine murine) (487). Dans le cas des cellules iPS humaines, Jiang *et al.* et Zou *et al.* ont analysé les marqueurs Oct4, SSEA-4, Tra-1-60, ainsi que le marquage de Nanog pour la seconde équipe (488,489). Nous avons utilisé exactement les mêmes marqueurs (à l'exception de SSEA-1 spécifique des cellules iPS murines) en immunofluorescence et/ou en cytométrie en flux pour prouver la pluripotence de nos cellules iPS. Nous aurions également pu réaliser le marquage de SSEA-3 et Tra-1-81 par immunofluorescence, mais quatre marqueurs sont suffisants pour démontrer le phénotype pluripotent.

Le test de formation de tératomes, tumeurs solides bénignes composées de cellules dérivées des 3 lignées embryonnaires (mésoderme, ectoderme et endoderme), était jusqu'à présent le seul moyen de montrer que les cellules souches humaines possèdent une capacité de pluripotence *in vivo* après transplantation. Pourtant, seule la moitié des articles récents traitant de la génération de lignées ES ou iPS rapportent ce test (495). Ainsi, son utilisation comme le « gold standard » est actuellement discutée (496). D'une part, cette technique est lourde à mettre en place, très consommatrice en temps (plusieurs mois) et surtout très coûteuse notamment à cause de l'utilisation d'un grand nombre de souris immunodéprimées, ce qui soulève également un débat éthique (497). D'autre part, il n'existe aucune manière standardisée pour former des tératomes (quantité de cellules, site d'injection, temps de croissance...) puis pour les analyser (histologie et/ou

immunohistochimie, analyse fonction de la subjectivité et de l'expérience de l'expérimentateur) (495,498). Enfin, sa pertinence clinique ou biologique est remise en cause puisque des chercheurs ont montré que certaines cellules iPS partiellement reprogrammées pouvaient former des tératomes alors même que les résultats étaient négatifs pour d'autres tests de pluripotence (496). Et à l'inverse, certaines lignées considérées comme cellules iPS sont incapables d'induire la formation de tératomes pour des raisons inconnues (419). Cependant, l'existence d'un lien entre pluripotence et tumorigénicité fait que le test de formation de tératome pourrait permettre d'identifier certaines lignées iPS (ou ES) possédant un plus faible risque tumorigénique en vue d'une application thérapeutique (497). Pour toutes ces raisons, nous avons choisi de ne pas réaliser ce test de pluripotence *in vivo*, mais uniquement le test *in vitro* par la formation de corps embryoides (EBs). La génération d'EBs est en effet une méthode alternative *in vitro* facile à mettre en œuvre, reproductible et contrôlable, et donc utilisable en routine (499). De nombreuses méthodes ont été publiées pour générer des EBs, la plupart du temps décrites à partir des cellules ES (500). Parmi ces méthodes, les principales sont la culture en suspension liquide en boîtes de Pétri (493), en flasques avec agitation (501), en bioréacteurs (502,503), la technique de la goutte ou « hanging drop », le « spin » (504), la culture en plaques 96 puits non adhérents (505) ou en plaques Aggrewell™ commercialisées (506). Le choix de la technique ainsi que le choix d'une différenciation spontanée ou dirigée vers un lignage spécifique (504,507), est fonction de l'objectif visé. Pour prouver la pluripotence des cellules iPS, il est plus pertinent de choisir la différenciation spontanée, sans ajout de facteurs pouvant l'influencer. Trois techniques de formation des EBs ont été sélectionnées en fonction de leur compatibilité avec les moyens techniques et financiers disponibles au laboratoire : la suspension liquide en boîte de Pétri, la technique du « hanging drop » et le « spin ». Après comparaison de ces différentes techniques, la culture en suspension liquide nous est apparue la méthode la plus efficace et la plus simple à mettre en œuvre. Comme attendu avec cette méthode, la taille des corps embryoides générés est assez hétérogène, ce qui, en fonction de l'objectif, peut avoir un impact négatif. Cependant, elle est la méthode de choix pour démontrer la pluripotence puisqu'elle permet une plus grande hétérogénéité des types cellulaires obtenus. Ainsi des techniques comme le « hanging drop » et le « spin » par exemple, permettent un meilleur contrôle de la taille et de la reproductibilité de la formation des EBs, mais risquent d'influencer le potentiel de différenciation. De plus, celles-ci impliquent la dissociation des colonies en cellules isolées, ce qui réduit généralement la viabilité et le rendement de formation des EBs (499). Les corps embryoides obtenus par culture en suspension liquide nous ont permis de montrer que leur différenciation spontanée génère des types cellulaires issus des 3 lignages embryonnaires ; ceux-ci ont été détectés par l'utilisation d'anticorps dirigés contre des marqueurs spécifiques de chaque lignage en

immunofluorescence, à savoir l' α FP et CD31 pour l'endoderme, α SMA et Troponine I cardiaque pour le mésoderme, MAP2 et Nestine pour l'ectoderme (Figure 6). Mukherjee *et al.* et Jiang *et al.* ont généré leurs corps embryoides, à partir des cellules iPS murines et humaines respectivement, avec la technique que nous avons également privilégiée. Les marqueurs qu'ils ont choisis pour l'analyse de la pluripotence sont Tuj1 (ectoderme) et α FP (endoderme), et soit CD31 pour Jiang *et al.* soit α SMA pour Mukherjee *et al.* (487,489). Pour l'équipe de Zou *et al.*, aucune information n'est disponible concernant leur technique de formation des EBs ; ils ont également analysé l'expression de α SMA et α FP mais ont utilisé la β 3-tubuline comme marqueur de l'ectoderme (488). Tous ces marqueurs sont équivalents pour prouver l'appartenance à un lignage spécifique. Dans notre cas, nous avons choisi un kit de caractérisation (Millipore) déjà validé contenant 5 anticorps (α FP, α SMA, Troponine I cardiaque, MAP2 et Nestine) auquel nous avons ajouté l'anticorps dirigé contre la protéine de surface CD31 (342). Cette analyse de la pluripotence des EBs a été complétée par Mukherjee *et al.* par l'analyse de l'expression en RT-PCR de différents gènes impliqués dans la pluripotence ou la différenciation. En plus de la caractérisation de la pluripotence par la technique des EBs, ces trois équipes ont également formé des tératomes et les ont analysés soit uniquement par examen histologique (488,489), soit combiné à un marquage immunofluorescent (Tuj1, α FP et α SMA) (487).

La reprogrammation induisant une instabilité génomique, il est nécessaire de vérifier l'absence d'anomalies chromosomiques. La méthode de caryotypage conventionnelle est la plus couramment utilisée pour le suivi du statut génomique des cellules ES et iPS. Il est indispensable de réaliser le caryotype des cellules iPS en début de culture puis régulièrement, dans l'idéal tous les 10-15 passages, pour dépister précocement d'éventuelles aberrations chromosomiques (anomalies de nombre ou de structure) qui apparaîtraient en cours de culture (414). Dans notre étude, la mise au point de ce caryotype (avec marquage des bandes R) ayant été achevée récemment, seulement 5 métaphases ont été observées et leur caryotype analysé pour la lignée NP26 clone 4. Il est cependant nécessaire d'en observer au moins 30 avant de conclure à l'absence d'anomalies. En cas d'apparition d'une anomalie identique dans au moins deux métaphases différentes, le nombre de métaphases lues est complété à 50. L'analyse du caryotype devra donc être poursuivie pour cette lignée et il sera également réalisé pour les trois autres clones prochainement. Néanmoins, le caryotype ne permet pas l'analyse de l'ensemble des cellules iPS et une mosaïque de faible pourcentage peut donc ne pas être diagnostiquée. De plus, son niveau de résolution ne permet pas la détection d'anomalie inférieure à 10 Mb. Les méthodes d'analyse haute résolution (CGH array, SNP array...) ou le séquençage complet du génome sont des techniques plus résolutes. Cependant, celles-ci sont très coûteuses, lentes et requièrent une expertise pour l'analyse et l'interprétation parfois difficile des

données (508). A l'heure actuelle, comme les anomalies génomiques les plus fréquemment retrouvées impliquent des chromosomes entiers ou de larges fragments chromosomiques, le caryotype reste la solution idéale, simple et peu coûteuse pour le suivi en routine des cellules iPS (416). Seules les deux équipes ayant travaillé sur les cellules iPS humaines (Jiang *et al.* et Zou *et al.*) ont analysé le caryotype grâce à une coloration des bandes G mais aucune description de la technique utilisée n'est donnée. L'article de Zou *et al.* est le seul à préciser le nombre de métaphases observées (20 métaphases) et le nombre de cellules caryotypées (5 caryotypes). Ces deux techniques de coloration des chromosomes (bandes G et bandes R) donnent un marquage réciproque, c'est-à-dire que là où l'on obtient une bande sombre avec l'une des deux techniques, on observe une bande claire avec l'autre. Cependant, la coloration des bandes R est plus aisée car les chromosomes sont souvent moins compacts et nous avons donc préféré dans un premier temps utiliser cette technique.

Nos cellules iPS CGDX portent la même mutation que celle diagnostiquée chez le patient. Il s'agit d'une mutation de type faux-sens dans l'exon 5 de *CYBB* (469C>T). Mais il est établi que n'importe quel type de mutations sans « hot spot » peut-être à l'origine de la CGDX (43). Cette forme est donc très hétérogène et il serait intéressant de reprogrammer des fibroblastes de patients CGDX portant différentes mutations. Cela nous permettrait de consolider nos modèles physiopathologiques. C'est d'ailleurs ce qu'a fait Jiang *et al.* en utilisant des cellules de deux patients CGDX, l'un porteur d'une délétion large incluant les exons 1 à 3, et l'autre d'une mutation dans l'intron 1 (-11 T>G) du gène *CYBB* (489). Ils ont été les premiers à modéliser la mutation la plus courante de la forme CGDAR47, c'est-à-dire la délétion des nucléotides GC au début de l'exon 2 du gène *NCF1*, résultant en un décalage du cadre de lecture avec introduction d'un codon stop (48). Ils ont cependant généré uniquement des macrophages, et il serait très intéressant de produire des neutrophiles de ce type de CGD. L'équipe de Zou *et al.*, ayant produit des neutrophiles CGDX humains, a modélisé la mutation 458T>G située dans l'exon 5 résultant en une mutation non-sens, proche de celle que nous avons modélisée. Par contre, l'utilisation des souris CGDX par l'équipe de Mukherjee *et al.* ne permet pas de modéliser une mutation humaine puisque ces souris ont été créées par recombinaison homologe au niveau du gène *CYBB* (106).

D'autres tests pour caractériser les cellules iPS générées ont été réalisés par Mukherjee *et al.* et Jiang *et al.* En effet, ils ont également vérifié le bon *silencing* du transgène et l'expression endogène des facteurs de transcription, ainsi que l'activité phosphatase alcaline des colonies iPS (487,489). De plus, Jiang *et al.* a complété la caractérisation des cellules iPS en montrant, par analyse au bisulfite, un profil de méthylation des promoteurs de *NANOG* et *OCT4* similaire à celui de cellules ES. De même, le marquage de l'activité phosphatase alcaline a été réalisé sur nos lignées de cellules iPS par

l'équipe du Dr T. Saric avant leur envoi. Il serait également intéressant de vérifier le *silencing* du transgène dans nos lignées de cellules iPS. Cette analyse est prévue prochainement. Par contre, il ne nous a pas semblé nécessaire d'observer le profil de méthylation de l'ADN, d'autant plus que tous les autres tests ont confirmé la pluripotence des cellules iPS et que notre objectif est la modélisation physiopathologique.

PERSPECTIVES

A l'issue de ce travail, des cellules iPS spécifiques d'un patient CGDX, mais également des cellules iPS « contrôle », ont été produites et cultivées dans des conditions permettant leur auto-renouvellement et le maintien de leur pluripotence. Cette pluripotence a été validée par un ensemble de tests couramment utilisés. Bien que certaines analyses doivent être poursuivies comme le caryotype, ces cellules iPS sont parfaitement utilisables pour un objectif de modélisation physiopathologique.

Les objectifs de ce projet sont : (1) la production de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ issus de cellules iPS CGDX pour la transplantation dans des souris immunodéprimées et la génération de souris CGDX avec un système immunitaire humanisé, (2) la production de cellules hématopoïétiques matures (neutrophiles et macrophages) modèles de CGDX, et (3) la réalisation d'essais de thérapie protéique consistant en l'apport du cytochrome *b*₅₅₈ fonctionnel grâce à des protéoliposomes *in vitro*, voire *in vivo* dans les souris CGDX « humanisées ».

A partir des cellules iPS « contrôle » et CGDX présentées dans ce travail, nous avons réussi à produire des progéniteurs hématopoïétiques CD34+ selon un protocole publié et reproductible (509), et leur caractérisation phénotypique complète est en cours de réalisation. Ces progéniteurs seront très prochainement injectés à des souris immunodéprimées pour évaluer leur capacité à recoloniser la moelle osseuse et établir un système hématopoïétique et immunitaire humain. Pour cela, nous collaborons avec la société TransCure localisée à Archamps et spécialisée dans la génération de souris « humanisées ».

De même, nous avons réussi à obtenir des neutrophiles issus des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ « contrôle » et CGDX selon un protocole adapté de Choi *et al.* (509). Des macrophages ont également été générés grâce au protocole de différenciation publié par cette même équipe. Ces cellules phagocytaires sont en cours d'évaluation phénotypique et fonctionnelle.

Enfin, les premiers essais de thérapie protéique *in vitro* devraient être mis en œuvre au début de l'année 2014 avec les neutrophiles et macrophages CGDX. Les protéoliposomes apportant les sous-unités gp91^{phox} et p22^{phox} membranaires seront produits par la start-up Synthélis, issue de l'équipe TheREx (laboratoire TIMC/IMAG) basée à Meylan, et spécialisée dans la production à façon de protéines membranaires recombinantes.

Dès l'obtention de nos cellules iPS CGDAR47 et CGDAR22, leur caractérisation complète sera entreprise de la même façon que décrit dans ce travail sur les cellules iPS CGDX. Ces lignées pourront ensuite permettre de produire des progéniteurs hématopoïétiques CD34+ ainsi que cellules phagocytaires selon les protocoles de différenciation que nous avons mis en place au laboratoire.

Depuis leur création 7 ans plus tôt, et grâce aux avancées techniques qui ont accompagné leur développement ces dernières années, les cellules iPS sont devenues un outil majeur en Recherche. En permettant de modéliser de nombreuses pathologies, elles ouvrent la voie vers le développement de nouveaux médicaments et nouvelles approches thérapeutiques, et cela à très court terme. Leur utilisation clinique, par contre, nécessitera encore des améliorations au niveau des techniques de reprogrammation, de culture cellulaire, de caractérisation phénotypique, fonctionnelle et génétique ainsi que de différenciation vers un type cellulaire donné. Dans quelques années, elles pourront donc peut-être permettre le traitement de patients par thérapie cellulaire ou génique, une avancée porteuse d'espoir dans de nombreuses pathologies.

THESE SOUTENUE PAR : Julie BRAULT

TITRE :

**VERS LA MODELISATION PHYSIOPATHOLOGIQUE DE LA GRANULOMATOSE SEPTIQUE CHRONIQUE
POUR DE NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES**

Développement de la culture des cellules souches pluripotentes induites issues de fibroblastes de patients

CONCLUSION

La Granulomatose septique chronique (CGD) est une maladie génétique orpheline (1/200 000 naissances) de l'immunodéficiência innée affectant généralement les enfants en bas âge (< 2 ans), diagnostiquée devant des infections sévères et récidivantes. Les phagocytes sont dépourvus d'activité NADPH oxydase, enzyme clé de la production de réactifs toxiques de l'oxygène (ROS) bactéricides. Les mutations dans le gène *CYBB* codant la sous-unité membranaire gp91^{phox} (NOX2) sont responsables de la forme majeure liée à l'X (CGDX) (65 % des cas). Une prophylaxie antibiotique et antifongique à vie est généralement instaurée le plus précocement possible. Le seul traitement curatif repose sur la transplantation de moelle osseuse allogénique mais n'est pas sans danger pour le patient. La thérapie génique a été tentée à plusieurs reprises mais avec un bénéfice clinique uniquement transitoire. Afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques, il est nécessaire de développer des modèles cellulaires et animaux mimant la maladie. Or, les modèles cellulaires actuellement disponibles sont imparfaits.

Depuis les travaux de l'équipe du Dr S. Yamanaka (prix Nobel 2012 de Médecine) en 2006, il est possible d'induire la reprogrammation de cellules différenciées en cellules souches par transfection rétrovirale de 4 facteurs de transcription (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc). Elles sont appelées cellules souches pluripotentes induites (iPS), elles possèdent les mêmes propriétés d'auto-renouvellement et de pluripotence que les cellules souches embryonnaires et, pour cette raison, sont très utiles pour la modélisation de pathologies, le screening de nouveaux traitements, la toxicologie, la médecine régénérative...

L'objectif de ce travail a été de mettre en place la culture des cellules iPS reprogrammées à partir des fibroblastes d'un patient CGDX et de caractériser leur pluripotence. Pour la culture cellulaire, deux méthodes ont été testées (sur cellules nourricières ou sur matrice extracellulaire) et validées pour le maintien des cellules dans un état indifférencié. De plus, ces cellules iPS expriment les facteurs de transcription Oct3/4, Sox2 et Nanog, ainsi que les différents marqueurs de pluripotence SSEA-3, SSEA-4 et Tra-1-81. Concernant leur capacité de pluripotence, les cellules iPS ont montré leur abilité à former spontanément, en suspension liquide, des corps embryoides composés de cellules issues des trois lignées embryonnaires. Une technique de caryotype a été développée pour permettre d'analyser la stabilité chromosomique des cellules iPS en cours de culture. Même si cette analyse doit être poursuivie, nous n'avons pas détecté pour l'instant d'anomalies de nombre ou de structure. Pour finir, ces cellules iPS CGDX portent l'anomalie génétique responsable de la pathologie chez le patient dont elles sont issues.

Ces cellules iPS témoin et CGDX serviront à générer des modèles cellulaires et animaux de la forme CGDX pour tester de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, il est possible de différencier les cellules iPS en progéniteurs hématopoïétiques CD34+. Ceux-ci permettront la génération de souris humanisées par transplantation, ainsi que la production de cellules phagocytaires matures (neutrophiles et macrophages) par différenciation terminale.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 12/08/2014

LE DOYEN

Professeur Christophe RUAUT



LE PRESIDENT DE LA THESE

Professeur Michel SEVE



BIBLIOGRAPHIE

1. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)*. mai 2000;79(3):155-169.
2. Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. févr 2010;38(1):3-10.
3. Janeway C, Craig J, Davidson M. Hypergammaglobulinemia associated with severe, recurrent and chronic non-specific infection. *Am J Dis Child*. 1954;88:388-92.
4. Berendes H, Bridges RA, Good RA. A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn Med*. mai 1957;40(5):309-312.
5. Bridges RA, Berendes H, Good RA. A fatal granulomatous disease of childhood; the clinical, pathological, and laboratory features of a new syndrome. *AMA J Dis Child*. avr 1959;97(4):387-408.
6. Holmes B, Quie PG, Windhorst DB, Good RA. Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. *Lancet*. 4 juin 1966;1(7449):1225-1228.
7. Quie PG, White JG, Holmes B, Good RA. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J Clin Invest*. avr 1967;46(4):668-679.
8. Baehner RL, Karnovsky ML. Deficiency of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide oxidase in chronic granulomatous disease. *Science*. 13 déc 1968;162(3859):1277-1279.
9. Baehner RL, Nathan DG. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. *Science*. 17 févr 1967;155(3764):835-836.
10. Azimi PH, Bodenbender JG, Hintz RL, Kontras SB. Chronic granulomatous disease in three female siblings. *JAMA J Am Med Assoc*. 23 déc 1968;206(13):2865-2870.
11. Quie PG, Kaplan EL, Page AR, Gruskay FL, Malawista SE. Defective polymorphonuclear-leukocyte function and chronic granulomatous disease in two female children. *N Engl J Med*. 2 mai 1968;278(18):976-980.
12. Seger RA. Modern management of chronic granulomatous disease. *Br J Haematol*. févr 2008;140(3):255-266.
13. Segal AW. Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease. *Nature*. 5 mars 1987;326(6108):88-91.
14. Li Y, Kim J-G, Kim H-J, Moon M-Y, Lee J-Y, Kim J, et al. Small GTPases Rap1 and RhoA regulate superoxide formation by Rac1 GTPases activation during the phagocytosis of IgG-opsonized zymosans in macrophages. *Free Radic Biol Med*. 1 mai 2012;52(9):1796-1805.
15. Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Ben Mkaddem S, Coant N, Daniel F, et al. [The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases]. *Médecine Sci MS*. nov 2006;22(11):953-959.
16. Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol*. juill 1983;97(1):52-61.
17. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. mai 2000;79(3):170-200.
18. Dinuer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*. nov 1990;86(5):1729-1737.
19. Taylor WR, Jones DT, Segal AW. A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain. *Protein Sci Publ Protein Soc*. oct 1993;2(10):1675-1685.
20. Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinuer MC. Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem*. 17 août 2001;276(33):31105-31112.
21. Krause K-H, Lambeth D, Krönke M. NOX enzymes as drug targets. *Cell Mol Life Sci CMLS*. juill 2012;69(14):2279-2282.

22. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* mars 2004;4(3):181-189.
23. Meijles DN, Howlin BJ, Li J-M. Consensus in silico computational modelling of the p22phox subunit of the NADPH oxidase. *Comput Biol Chem.* août 2012;39:6-13.
24. Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J.* 15 mars 2005;386(Pt 3):401-416.
25. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* janv 2007;87(1):245-313.
26. Volpp BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* sept 1989;86(18):7195-7199.
27. El-Benna J, Dang PM-C, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC, Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med.* 30 avr 2009;41(4):217-225.
28. Dang PM-C, Raad H, Derkawi RA, Boussetta T, Paclet M-H, Belambri SA, et al. The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem Pharmacol.* 1 nov 2011;82(9):1145-1152.
29. Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem.* 3 juill 1998;273(27):16663-16668.
30. Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J.* 15 déc 1993;296 (Pt 3):557-561.
31. Cross AR. p40(phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558). *Biochem J.* 1 juill 2000;349(Pt 1):113-117.
32. Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, et al. The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J.* 2 déc 2002;21(23):6312-6320.
33. Lopes LR, Dagher M-C, Gutierrez A, Young B, Bouin A-P, Fuchs A, et al. Phosphorylated p40PHOX as a negative regulator of NADPH oxidase. *Biochemistry (Mosc).* 30 mars 2004;43(12):3723-3730.
34. Sathyamoorthy M, de Mendez I, Adams AG, Leto TL. p40(phox) down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J Biol Chem.* 4 avr 1997;272(14):9141-9146.
35. Matute JD, Arias AA, Dinauer MC, Patiño PJ. p40phox: the last NADPH oxidase subunit. *Blood Cells Mol Dis.* oct 2005;35(2):291-302.
36. Suh C-I, Stull ND, Li XJ, Tian W, Price MO, Grinstein S, et al. The phosphoinositide-binding protein p40phox activates the NADPH oxidase during FcγRIIIA receptor-induced phagocytosis. *J Exp Med.* 7 août 2006;203(8):1915-1925.
37. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature.* 17 oct 1991;353(6345):668-670.
38. Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science.* 6 déc 1991;254(5037):1512-1515.
39. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci CMLS.* sept 2002;59(9):1428-1459.
40. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 15 janv 2007;176(2):231-241.
41. Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, Siler U, Seger RA, Zychlinsky A, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood.* 24 sept 2009;114(13):2619-2622.
42. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, et al. Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature.* 3 juill 1986;322(6074):32-38.

43. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, Lopez JA, Ariga T, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis.* 15 oct 2010;45(3):246-265.
44. Rae J, Newburger PE, Dinanier MC, Noack D, Hopkins PJ, Kuruto R, et al. X-Linked Chronic Granulomatous Disease: Mutations in the CYBB Gene Encoding the gp91-phox Component of Respiratory-Burst Oxidase. *Am J Hum Genet.* juin 1998;62(6):1320-1331.
45. Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol.* oct 2003;15(5):578-584.
46. Stasia MJ, Li XJ. Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol.* juill 2008;30(3):209-235.
47. Stasia MJ, Brion J-P, Boutonnat J, Morel F. Severe clinical forms of cytochrome b-negative chronic granulomatous disease (X91-) in 3 brothers with a point mutation in the promoter region of CYBB. *J Infect Dis.* 15 nov 2003;188(10):1593-1604.
48. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Bustamante J, Kannengiesser C, de Boer M, et al. Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (second update). *Blood Cells Mol Dis.* 15 avr 2010;44(4):291-299.
49. Bakri FG, Martel C, Khuri-Bulos N, Mahafzah A, El-Khateeb MS, Al-Wahadneh AM, et al. First report of clinical, functional, and molecular investigation of chronic granulomatous disease in nine Jordanian families. *J Clin Immunol.* mars 2009;29(2):215-230.
50. Chanock SJ, Roesler J, Zhan S, Hopkins P, Lee P, Barrett DT, et al. Genomic structure of the human p47-phox (NCF1) gene. *Blood Cells Mol Dis.* févr 2000;26(1):37-46.
51. Görlach A, Lee PL, Roesler J, Hopkins PJ, Christensen B, Green ED, et al. A p47-phox pseudogene carries the most common mutation causing p47-phox- deficient chronic granulomatous disease. *J Clin Invest.* 15 oct 1997;100(8):1907-1918.
52. Roos D, de Boer M, Köker MY, Dekker J, Singh-Gupta V, Ahlin A, et al. Chronic granulomatous disease caused by mutations other than the common GT deletion in NCF1, the gene encoding the p47phox component of the phagocyte NADPH oxidase. *Hum Mutat.* déc 2006;27(12):1218-1229.
53. Kenney RT, Malech HL, Epstein ND, Roberts RL, Leto TL. Characterization of the p67phox gene: genomic organization and restriction fragment length polymorphism analysis for prenatal diagnosis in chronic granulomatous disease. *Blood.* 15 déc 1993;82(12):3739-3744.
54. Badalzadeh M, Fattahi F, Fazlollahi MR, Tajik S, Bemanian MH, Behmanesh F, et al. Molecular analysis of four cases of chronic granulomatous disease caused by defects in NCF-2: the gene encoding the p67-phox. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* déc 2012;11(4):340-344.
55. Roesler J, Segerer F, Morbach H, Kleinert S, Thieme S, Rösen-Wolff A, et al. P67-phox (NCF2) lacking exons 11 and 12 is functionally active and leads to an extremely late diagnosis of chronic granulomatous disease (CGD). *PloS One.* 2012;7(4):e34296.
56. Jesenak M, Havlicekova Z, Banovcin P, Stasia MJ. Chronic granulomatous disease caused by a novel mutation in a 2-month-old boy with multifocal splenic abscesses. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2013;23(2):137-138.
57. Martel C, Mollin M, Beaumel S, Brion JP, Coutton C, Satre V, et al. Clinical, functional and genetic analysis of twenty-four patients with chronic granulomatous disease - identification of eight novel mutations in CYBB and NCF2 genes. *J Clin Immunol.* oct 2012;32(5):942-958.
58. Zhan S, Vazquez N, Zhan S, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, et al. Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood.* 1 oct 1996;88(7):2714-2721.
59. Matute JD, Arias AA, Wright NAM, Wrobel I, Waterhouse CCM, Li XJ, et al. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood.* 8 oct 2009;114(15):3309-3315.

60. Kang EM, Malech HL. Advances in treatment for chronic granulomatous disease. *Immunol Res.* 2009;43(1-3):77-84.
61. Van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, et al. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One.* 2009;4(4):e5234.
62. Roos D. The genetic basis of chronic granulomatous disease. *Immunol Rev.* avr 1994;138:121-157.
63. Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, et al. Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med.* 30 déc 2010;363(27):2600-2610.
64. Stasia MJ, Cathebras P, Lutz M-F, Durieu I. La granulomatose septique chronique. *Rev Médecine Interne.* mars 2009;30(3):221-232.
65. Greenberg DE, Ding L, Zelazny AM, Stock F, Wong A, Anderson VL, et al. A Novel Bacterium Associated with Lymphadenitis in a Patient with Chronic Granulomatous Disease. *PLoS Pathog.* 2006;2(4):e28.
66. López FCR, de Luna FF-A, Delgado MCG, de la Rosa II, Valdezate S, Nieto JAS, et al. *Granulibacter* *bethesdensis* isolated in a child patient with chronic granulomatous disease. *J Infect.* sept 2008;57(3):275-277.
67. Seger RA. Chronic granulomatous disease: recent advances in pathophysiology and treatment. *Neth J Med.* nov 2010;68(11):334-340.
68. Morgenstern DE, Gifford MA, Li LL, Doerschuk CM, Dinuer MC. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J Exp Med.* 20 janv 1997;185(2):207-218.
69. Rieber N, Hector A, Kuijpers T, Roos D, Hartl D. Current concepts of hyperinflammation in chronic granulomatous disease. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:252460.
70. Cale CM, Morton L, Goldblatt D. Cutaneous and other lupus-like symptoms in carriers of X-linked chronic granulomatous disease: incidence and autoimmune serology. *Clin Exp Immunol.* avr 2007;148(1):79-84.
71. Wolach B, Scharf Y, Gavrieli R, de Boer M, Roos D. Unusual late presentation of X-linked chronic granulomatous disease in an adult female with a somatic mosaic for a novel mutation in CYBB. *Blood.* 1 janv 2005;105(1):61-66.
72. Liese JG, Jendrossek V, Jansson A, Petropoulou T, Kloos S, Gahr M, et al. Chronic granulomatous disease in adults. *Lancet.* 27 janv 1996;347(8996):220-223.
73. Mauch L, Lun A, O'Gorman MRG, Harris JS, Schulze I, Zychlinsky A, et al. Chronic granulomatous disease (CGD) and complete myeloperoxidase deficiency both yield strongly reduced dihydrorhodamine 123 test signals but can be easily discerned in routine testing for CGD. *Clin Chem.* mai 2007;53(5):890-896.
74. Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, et al. Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry; useful screening tests for chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol.* mai 2013;33(4):857-864.
75. Köker MY, Camcıoğlu Y, van Leeuwen K, Kılıç SŞ, Barlan I, Yılmaz M, et al. Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients. *J Allergy Clin Immunol.* 30 juill 2013;
76. Stasia MJ, Mollin M, Martel C, Satre V, Coutton C, Amblard F, et al. Functional and genetic characterization of two extremely rare cases of Williams-Beuren syndrome associated with chronic granulomatous disease. *Eur J Hum Genet EJHG.* 23 janv 2013;
77. Maly FE, Cross AR, Jones OT, Wolf-Vorbeck G, Walker C, Dahinden CA, et al. The superoxide generating system of B cell lines. Structural homology with the phagocytic oxidase and triggering via surface Ig. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 avr 1988;140(7):2334-2339.
78. Volkman DJ, Buescher ES, Gallin JI, Fauci AS. B cell lines as models for inherited phagocytic diseases: abnormal superoxide generation in chronic granulomatous disease and giant granules in Chediak-Higashi syndrome. *J Immunol Baltim Md 1950.* déc 1984;133(6):3006-3009.

79. Morel F, Cohen Tanugi Cholley L, Brandolin G, Dianoux AC, Martel C, Champelovier P, et al. The O₂-generating oxidase of B lymphocytes: Epstein-Barr virus-immortalized B lymphocytes as a tool for the identification of defective components of the oxidase in chronic granulomatous disease. *Biochim Biophys Acta*. 4 août 1993;1182(1):101-109.
80. Chetty M, Thrasher AJ, Abo A, Casimir CM. Low NADPH oxidase activity in Epstein-Barr-virus-immortalized B-lymphocytes is due to a post-transcriptional block in expression of cytochrome b558. *Biochem J*. 15 févr 1995;306 (Pt 1):141-145.
81. Stasia MJ, Bordigoni P, Floret D, Brion JP, Bost-Bru C, Michel G, et al. Characterization of six novel mutations in the CYBB gene leading to different sub-types of X-linked chronic granulomatous disease. *Hum Genet*. janv 2005;116(1-2):72-82.
82. Porter CD, Parkar MH, Levinsky RJ, Collins MK, Kinnon C. X-linked chronic granulomatous disease: correction of NADPH oxidase defect by retrovirus-mediated expression of gp91-phox. *Blood*. 1 oct 1993;82(7):2196-2202.
83. Thrasher A, Chetty M, Casimir C, Segal AW. Restoration of superoxide generation to a chronic granulomatous disease-derived B-cell line by retrovirus mediated gene transfer. *Blood*. 1 sept 1992;80(5):1125-1129.
84. Tucker KA, Lilly MB, Heck L Jr, Rado TA. Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood*. août 1987;70(2):372-378.
85. Katschinski DM, Robins HI, Schad M, Frede S, Fandrey J. Role of tumor necrosis factor alpha in hyperthermia-induced apoptosis of human leukemia cells. *Cancer Res*. 15 juill 1999;59(14):3404-3410.
86. Pedruzzi E, Fay M, Elbim C, Gaudry M, Gougerot-Pocidalo M-A. Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br J Haematol*. juin 2002;117(3):719-726.
87. Li XJ, Grunwald D, Mathieu J, Morel F, Stasia M-J. Crucial role of two potential cytosolic regions of Nox2, 191TSSTKTIRRS200 and 484DESQANHFAVHHDEEKD500, on NADPH oxidase activation. *J Biol Chem*. 15 avr 2005;280(15):14962-14973.
88. Carrichon L, Picciocchi A, Debeurme F, Defendi F, Beaumel S, Jesaitis AJ, et al. Characterization of superoxide overproduction by the D-Loop(Nox4)-Nox2 cytochrome b(558) in phagocytes-Differential sensitivity to calcium and phosphorylation events. *Biochim Biophys Acta*. janv 2011;1808(1):78-90.
89. Pivot-Pajot C, Chouinard FC, El Azreq MA, Harbour D, Bourgoin SG. Characterisation of degranulation and phagocytic capacity of a human neutrophilic cellular model, PLB-985 cells. *Immunobiology*. 2010;215(1):38-52.
90. Zhen L, King AA, Xiao Y, Chanock SJ, Orkin SH, Dinanuer MC. Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 nov 1993;90(21):9832-9836.
91. Debeurme F, Picciocchi A, Dagher M-C, Grunwald D, Beaumel S, Fieschi F, et al. Regulation of NADPH oxidase activity in phagocytes: relationship between FAD/NADPH binding and oxidase complex assembly. *J Biol Chem*. 22 oct 2010;285(43):33197-33208.
92. Picciocchi A, Debeurme F, Beaumel S, Dagher M-C, Grunwald D, Jesaitis AJ, et al. Role of putative second transmembrane region of Nox2 protein in the structural stability and electron transfer of the phagocytic NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 12 août 2011;286(32):28357-28369.
93. Luzzio BB, Luzzio CB. Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer J Int Cancer*. janv 1977;19(1):136.
94. Andersson LC, Jokinen M, Gahmberg CG. Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562. *Nature*. 22 mars 1979;278(5702):364-365.
95. Marie JP, Izaguirre CA, Civin CI, Mirro J, McCulloch EA. The presence within single K-562 cells of erythropoietic and granulopoietic differentiation markers. *Blood*. oct 1981;58(4):708-711.

96. Gewirtz AM, Burger D, Rado TA, Benz EJ Jr, Hoffman R. Constitutive expression of platelet glycoproteins by the human leukemia cell line K562. *Blood*. sept 1982;60(3):785-789.
97. Parkos CA, Dinanuer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci U S A*. mai 1988;85(10):3319-3323.
98. De Mendez I, Leto TL. Functional reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase by transfection of its multiple components in a heterologous system. *Blood*. 15 févr 1995;85(4):1104-1110.
99. Biberstine-Kinkade KJ, Yu L, Stull N, LeRoy B, Bennett S, Cross A, et al. Mutagenesis of p22(phox) histidine 94. A histidine in this position is not required for flavocytochrome b558 function. *J Biol Chem*. 16 août 2002;277(33):30368-30374.
100. Yu L, Zhen L, Dinanuer MC. Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits. *J Biol Chem*. 24 oct 1997;272(43):27288-27294.
101. Price MO, McPhail LC, Lambeth JD, Han C-H, Knaus UG, Dinanuer MC. Creation of a genetic system for analysis of the phagocyte respiratory burst: high-level reconstitution of the NADPH oxidase in a nonhematopoietic system. *Blood*. 15 avr 2002;99(8):2653-2661.
102. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. juill 1977;36(1):59-74.
103. Bánfi B, Clark RA, Steger K, Krause K-H. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem*. 7 févr 2003;278(6):3510-3513.
104. Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause K-H. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*. 29 oct 2004;279(44):46065-46072.
105. Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HHHW, Busse R, Brandes RP. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 29 oct 2004;279(44):45935-45941.
106. Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, et al. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet*. févr 1995;9(2):202-209.
107. Jackson SH, Gallin JI, Holland SM. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J Exp Med*. 1 sept 1995;182(3):751-758.
108. Fernandez-Boyanapalli R, Frasci SC, Riches DWH, Vandivier RW, Henson PM, Bratton DL. PPAR γ activation normalizes resolution of acute sterile inflammation in murine chronic granulomatous disease. *Blood*. 25 nov 2010;116(22):4512-4522.
109. Fujita M, Harada E, Matsumoto T, Mizuta Y, Ikegame S, Ouchi H, et al. Impaired host defence against *Mycobacterium avium* in mice with chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol*. juin 2010;160(3):457-460.
110. Zelazny AM, Ding L, Elloumi HZ, Brinster LR, Benedetti F, Czapiga M, et al. Virulence and cellular interactions of *Burkholderia multivorans* in chronic granulomatous disease. *Infect Immun*. oct 2009;77(10):4337-4344.
111. Nakano Y, Longo-Guess CM, Bergstrom DE, Nauseef WM, Jones SM, Bánfi B. Mutation of the *Cyba* gene encoding p22phox causes vestibular and immune defects in mice. *J Clin Invest*. mars 2008;118(3):1176-1185.
112. Seger RA. Advances in the diagnosis and treatment of chronic granulomatous disease. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 11 nov 2010 [cité 18 juill 2011]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21076296>
113. Liese J, Kloos S, Jendrosseck V, Petropoulou T, Wintergerst U, Notheis G, et al. Long-term follow-up and outcome of 39 patients with chronic granulomatous disease. *J Pediatr*. nov 2000;137(5):687-693.
114. Margolis DM, Melnick DA, Alling DW, Gallin JI. Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in the management of chronic granulomatous disease. *J Infect Dis*. sept 1990;162(3):723-726.

115. Goldblatt D. Current treatment options for chronic granulomatous disease. *Expert Opin Pharmacother*. juill 2002;3(7):857-863.
116. Gallin JI, Alling DW, Malech HL, Wesley R, Koziol D, Marciano B, et al. Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*. 12 juin 2003;348(24):2416-2422.
117. Hodiamont CJ, Dolman KM, Ten Berge IJM, Melchers WJG, Verweij PE, Pajkrt D. Multiple-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery. *Med Mycol Off Publ Int Soc Hum Anim Mycol*. mars 2009;47(2):217-220.
118. Ezekowitz RA, Dinanuer MC, Jaffe HS, Orkin SH, Newburger PE. Partial correction of the phagocyte defect in patients with X-linked chronic granulomatous disease by subcutaneous interferon gamma. *N Engl J Med*. 21 juill 1988;319(3):146-151.
119. Sechler JM, Malech HL, White CJ, Gallin JI. Recombinant human interferon-gamma reconstitutes defective phagocyte function in patients with chronic granulomatous disease of childhood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. juill 1988;85(13):4874-4878.
120. Ezekowitz RA, Sieff CA, Dinanuer MC, Nathan DG, Orkin SH, Newburger PE. Restoration of phagocyte function by interferon-gamma in X-linked chronic granulomatous disease occurs at the level of a progenitor cell. *Blood*. 15 déc 1990;76(12):2443-2448.
121. International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*. 21 févr 1991;324(8):509-516.
122. Bemiller LS, Roberts DH, Starko KM, Curnutte JT. Safety and effectiveness of long-term interferon gamma therapy in patients with chronic granulomatous disease. *Blood Cells Mol Dis*. 1995;21(3):239-247.
123. Marciano BE, Wesley R, De Carlo ES, Anderson VL, Barnhart LA, Darnell D, et al. Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 sept 2004;39(5):692-699.
124. Weening RS, Leitz GJ, Seger RA. Recombinant human interferon-gamma in patients with chronic granulomatous disease--European follow up study. *Eur J Pediatr*. avr 1995;154(4):295-298.
125. Jackson SH, Miller GF, Segal BH, Mardiney M 3rd, Domachowske JB, Gallin JI, et al. IFN-gamma is effective in reducing infections in the mouse model of chronic granulomatous disease (CGD). *J Interf Cytokine Res Off J Int Soc Interf Cytokine Res*. août 2001;21(8):567-573.
126. Condino-Neto A, Newburger PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood*. 1 juin 2000;95(11):3548-3554.
127. Ishibashi F, Mizukami T, Kanegasaki S, Motoda L, Kakinuma R, Endo F, et al. Improved superoxide-generating ability by interferon gamma due to splicing pattern change of transcripts in neutrophils from patients with a splice site mutation in CYBB gene. *Blood*. 15 juill 2001;98(2):436-441.
128. Woodman RC, Erickson RW, Rae J, Jaffe HS, Curnutte JT. Prolonged recombinant interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease: evidence against enhanced neutrophil oxidase activity. *Blood*. 15 mars 1992;79(6):1558-1562.
129. Martire B, Rondelli R, Soresina A, Pignata C, Broccoletti T, Finocchi A, et al. Clinical features, long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease: an Italian multicenter study. *Clin Immunol Orlando Fla*. févr 2008;126(2):155-164.
130. Mouy R, Seger R, Bourquin JP, Veber F, Blanche S, Griscelli C, et al. Interferon gamma for chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*. 21 nov 1991;325(21):1516-1517.
131. Greenberg DE, Shoffner AR, Zelazny AM, Fenster ME, Zarembek KA, Stock F, et al. Recurrent *Granulibacter* *bethesdensis* Infections and Chronic Granulomatous Disease. *Emerg Infect Dis*. sept 2010;16(9):1341-1348.
132. Segal BH, Barnhart LA, Anderson VL, Walsh TJ, Malech HL, Holland SM. Posaconazole as salvage therapy in patients with chronic granulomatous disease and invasive filamentous fungal infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 juin 2005;40(11):1684-1688.

133. Walsh TJ, Lutsar I, Driscoll T, Dupont B, Roden M, Ghahramani P, et al. Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children. *Pediatr Infect Dis J.* mars 2002;21(3):240-248.
134. Lublin M, Bartlett DL, Danforth DN, Kauffman H, Gallin JI, Malech HL, et al. Hepatic abscess in patients with chronic granulomatous disease. *Ann Surg.* mars 2002;235(3):383-391.
135. Fanconi S, Seger R, Gmür J, Willi U, Schaer G, Spiess H, et al. Surgery and granulocyte transfusions for life-threatening infections in chronic granulomatous disease. *Helv Paediatr Acta.* sept 1985;40(4):277-284.
136. Leiding JW, Freeman AF, Marciano BE, Anderson VL, Uzel G, Malech HL, et al. Corticosteroid therapy for liver abscess in chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 mars 2012;54(5):694-700.
137. Schäppi MG, Smith VV, Goldblatt D, Lindley KJ, Milla PJ. Colitis in chronic granulomatous disease. *Arch Dis Child.* févr 2001;84(2):147-151.
138. Zanditenas D, Hagège H, Rosa I, Cattan P, Ratel-Saby S, Lons T, et al. [Inflammatory colitis and chronic granulomatous disease, a steroid-dependent case report]. *Gastroentérologie Clin Biol.* avr 2004;28(4):398-401.
139. Rosh JR, Tang HB, Mayer L, Groisman G, Abraham SK, Prince A. Treatment of intractable gastrointestinal manifestations of chronic granulomatous disease with cyclosporine. *J Pediatr.* janv 1995;126(1):143-145.
140. Sokol H, Suarez F, Meatchi T, Malamut G, Pocidalo M-A, Blanche S, et al. Thalidomide as a treatment for refractory CGD colitis. *Am J Gastroenterol.* avr 2009;104(4):1069.
141. Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Arai K, Oana S, Harayama S, et al. Thalidomide attenuates excessive inflammation without interrupting lipopolysaccharide-driven inflammatory cytokine production in chronic granulomatous disease. *Clin Immunol Orlando Fla.* mai 2013;147(2):122-128.
142. Stein RB, Hanauer SB. Medical therapy for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* juin 1999;28(2):297-321.
143. Deffert C, Olleros ML, Huiping Y, Herrmann FR, Zekry D, Garcia I, et al. TNF- α blockade in chronic granulomatous disease-induced hyperinflammation: patient analysis and murine model. *J Allergy Clin Immunol.* sept 2011;128(3):675-677.
144. Uzel G, Orange JS, Poliak N, Marciano BE, Heller T, Holland SM. Complications of tumor necrosis factor- α blockade in chronic granulomatous disease-related colitis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 déc 2010;51(12):1429-1434.
145. Buescher ES, Gallin JI. Leukocyte transfusions in chronic granulomatous disease: persistence of transfused leukocytes in sputum. *N Engl J Med.* 23 sept 1982;307(13):800-803.
146. Bielorai B, Toren A, Wolach B, Mandel M, Golan H, Neumann Y, et al. Successful treatment of invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease by granulocyte transfusions followed by peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* nov 2000;26(9):1025-1028.
147. Vamvakas EC, Pineda AA. Determinants of the efficacy of prophylactic granulocyte transfusions: a meta-analysis. *J Clin Apheresis.* 1997;12(2):74-81.
148. Stroncek DF, Leonard K, Eiber G, Malech HL, Gallin JI, Leitman SF. Alloimmunization after granulocyte transfusions. *Transfusion (Paris).* déc 1996;36(11-12):1009-1015.
149. Heim KF, Fleisher TA, Stroncek DF, Holland SM, Gallin JI, Malech HL, et al. The relationship between alloimmunization and posttransfusion granulocyte survival: experience in a chronic granulomatous disease cohort. *Transfusion (Paris).* juin 2011;51(6):1154-1162.
150. Goździk J, Pituch-Noworolska A, Skoczeń S, Czogała W, Wędrychowicz A, Baran J, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation as therapy for chronic granulomatous disease--single centre experience. *J Clin Immunol.* juin 2011;31(3):332-337.

151. Goudemand J, Anssens R, Delmas-Marsalet Y, Farriaux JP, Fontaine G. [Attempt to treat a case of chronic familial granulomatous disease by allogeneic bone marrow transplantation]. *Arch Françaises Pédiatrie*. févr 1976;33(2):121-129.
152. Rappeport JM, Newburger PE, Goldblum RM, Goldman AS, Nathan DG, Parkman R. Allogeneic bone marrow transplantation for chronic granulomatous disease. *J Pediatr*. déc 1982;101(6):952-955.
153. Di Bartolomeo P, Di Girolamo G, Angrilli F, Schettini F, De Mattia D, Manzionna MM, et al. Reconstitution of normal neutrophil function in chronic granulomatous disease by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. nov 1989;4(6):695-700.
154. Calviño MC, Maldonado MS, Otheo E, Muñoz A, Couselo JM, Burgaleta C. Bone marrow transplantation in chronic granulomatous disease. *Eur J Pediatr*. oct 1996;155(10):877-879.
155. Ho CM, Vowels MR, Lockwood L, Ziegler JB. Successful bone marrow transplantation in a child with X-linked chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant*. juill 1996;18(1):213-215.
156. Seger RA, Gungor T, Belohradsky BH, Blanche S, Bordigoni P, Di Bartolomeo P, et al. Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985-2000. *Blood*. 15 déc 2002;100(13):4344-4350.
157. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoablation for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*. 1 févr 1998;91(3):756-763.
158. Horwitz ME, Barrett AJ, Brown MR, Carter CS, Childs R, Gallin JI, et al. Treatment of chronic granulomatous disease with nonmyeloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. *N Engl J Med*. 22 mars 2001;344(12):881-888.
159. Nagler A, Ackerstein A, Kapelushnik J, Or R, Naparstek E, Slavin S. Donor lymphocyte infusion post-non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant*. août 1999;24(3):339-342.
160. Güngör T, Halter J, Klink A, Junge S, Stumpe KDM, Seger R, et al. Successful low toxicity hematopoietic stem cell transplantation for high-risk adult chronic granulomatous disease patients. *Transplantation*. 15 juin 2005;79(11):1596-1606.
161. Kang EM, Marciano BE, DeRavin S, Zarembek KA, Holland SM, Malech HL. Chronic granulomatous disease: overview and hematopoietic stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol*. juin 2011;127(6):1319-1326; quiz 1327-1328.
162. Kato K, Kojima Y, Kobayashi C, Mitsui K, Nakajima-Yamaguchi R, Kudo K, et al. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic granulomatous disease with inflammatory complications and severe infection. *Int J Hematol*. nov 2011;94(5):479-482.
163. Ozsahin H, von Planta M, Müller I, Steinert HC, Nadal D, Lauener R, et al. Successful treatment of invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease by bone marrow transplantation, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized granulocytes, and liposomal amphotericin-B. *Blood*. 15 oct 1998;92(8):2719-2724.
164. Soncini E, Slatter MA, Jones LBKR, Hughes S, Hodges S, Flood TJ, et al. Unrelated donor and HLA-identical sibling haematopoietic stem cell transplantation cure chronic granulomatous disease with good long-term outcome and growth. *Br J Haematol*. avr 2009;145(1):73-83.
165. Hasegawa D, Fukushima M, Hosokawa Y, Takeda H, Kawasaki K, Mizukami T, et al. Successful treatment of chronic granulomatous disease with fludarabine-based reduced-intensity conditioning and unrelated bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. janv 2008;87(1):88-90.
166. Martinez CA, Shah S, Shearer WT, Rosenblatt HM, Paul ME, Chinen J, et al. Excellent survival after sibling or unrelated donor stem cell transplantation for chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol*. janv 2012;129(1):176-183.

167. Schuetz C, Hoenig M, Schulz A, Lee-Kirsch MA, Roesler J, Friedrich W, et al. Successful unrelated bone marrow transplantation in a child with chronic granulomatous disease complicated by pulmonary and cerebral granuloma formation. *Eur J Pediatr.* août 2007;166(8):785-788.
168. Bhattacharya A, Slatter M, Curtis A, Chapman CE, Barge D, Jackson A, et al. Successful umbilical cord blood stem cell transplantation for chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant.* mars 2003;31(5):403-405.
169. Jaing T-H, Lee WI, Cheng P-J, Chen S-H, Huang J-L, Soong Y-K. Successful unrelated donor cord blood transplantation for chronic granulomatous disease. *Int J Hematol.* mai 2010;91(4):670-672.
170. Lin C-J, Wang S-C, Ku C-L, Kao J-K, Chen M, Liu C-S. Successful Unrelated Cord Blood Stem Cell Transplantation in an X-linked Chronic Granulomatous Disease Patient with Disseminated BCG-induced Infection. *Pediatr Neonatol.* 13 mai 2013;
171. Mochizuki K, Kikuta A, Ito M, Akaihata M, Sano H, Ohto H, et al. Successful unrelated cord blood transplantation for chronic granulomatous disease: a case report and review of the literature. *Pediatr Transplant.* mai 2009;13(3):384-389.
172. Parikh SH, Szabolcs P, Prasad VK, Lakshminarayanan S, Martin PL, Driscoll TA, et al. Correction of chronic granulomatous disease after second unrelated-donor umbilical cord blood transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* déc 2007;49(7):982-984.
173. Tewari P, Martin PL, Mendizabal A, Parikh SH, Page KM, Driscoll TA, et al. Myeloablative transplantation using either cord blood or bone marrow leads to immune recovery, high long-term donor chimerism and excellent survival in chronic granulomatous disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* sept 2012;18(9):1368-1377.
174. Wallet HL, Sobh M, Morisset S, Robin M, Fegueux N, Fürst S, et al. Double umbilical cord blood transplantation for hematological malignancies: a long- term analysis from the SFGM-TC registry. *Exp Hematol.* 2 juill 2013;
175. Goussetis E, Konialis CP, Peristeri I, Kitra V, Dimopoulou M, Petropoulou T, et al. Successful hematopoietic stem cell transplantation in 2 children with X-linked chronic granulomatous disease from their unaffected HLA-identical siblings selected using preimplantation genetic diagnosis combined with HLA typing. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* mars 2010;16(3):344-349.
176. Seger RA. Hematopoietic stem cell transplantation for chronic granulomatous disease. *Immunol Allergy Clin North Am.* mai 2010;30(2):195-208.
177. Stein S, Siler U, Ott MG, Seger R, Grez M. Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Curr Opin Mol Ther.* oct 2006;8(5):415-422.
178. Volpp BD, Lin Y. In vitro molecular reconstitution of the respiratory burst in B lymphoblasts from p47-phox-deficient chronic granulomatous disease. *J Clin Invest.* janv 1993;91(1):201-207.
179. Chanock SJ, Faust LR, Barrett D, Bizal C, Maly FE, Newburger PE, et al. O₂- production by B lymphocytes lacking the respiratory burst oxidase subunit p47phox after transfection with an expression vector containing a p47phox cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 nov 1992;89(21):10174-10177.
180. Li LL, Dinuer. Reconstitution of NADPH oxidase activity in human X-linked chronic granulomatous disease myeloid cells after stable gene transfer using a recombinant adeno-associated virus 2 vector. *Blood Cells Mol Dis.* déc 1998;24(4):522-538.
181. Thrasher AJ, Casimir CM, Kinnon C, Morgan G, Segal AW, Levinsky RJ. Gene transfer to primary chronic granulomatous disease monocytes. *Lancet.* 8 juill 1995;346(8967):92-93.
182. Ding C, Kume A, Björgvinsdóttir H, Hawley RG, Pech N, Dinuer MC. High-level reconstitution of respiratory burst activity in a human X-linked chronic granulomatous disease (X-CGD) cell line and correction of murine X-CGD bone marrow cells by retroviral-mediated gene transfer of human gp91phox. *Blood.* 1 sept 1996;88(5):1834-1840.

183. Björgvinsdóttir H, Ding C, Pech N, Gifford MA, Li LL, Dinayer MC. Retroviral-mediated gene transfer of gp91phox into bone marrow cells rescues defect in host defense against *Aspergillus fumigatus* in murine X-linked chronic granulomatous disease. *Blood*. 1 janv 1997;89(1):41-48.
184. Dinayer MC, Li LL, Björgvinsdóttir H, Ding C, Pech N. Long-term correction of phagocyte NADPH oxidase activity by retroviral-mediated gene transfer in murine X-linked chronic granulomatous disease. *Blood*. 1 août 1999;94(3):914-922.
185. Mardiney M 3rd, Jackson SH, Spratt SK, Li F, Holland SM, Malech HL. Enhanced host defense after gene transfer in the murine p47phox-deficient model of chronic granulomatous disease. *Blood*. 1 avr 1997;89(7):2268-2275.
186. Dinayer MC, Gifford MA, Pech N, Li LL, Emshwiller P. Variable correction of host defense following gene transfer and bone marrow transplantation in murine X-linked chronic granulomatous disease. *Blood*. 15 juin 2001;97(12):3738-3745.
187. Grez M, Becker S, Saulnier S, Knöss H, Ott MG, Maurer A, et al. Gene therapy of chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant*. mai 2000;25 Suppl 2:S99-104.
188. Ott M-G, Merget-Millitzer H, Ottmann OG, Martin H, Brüggelolte N, Bialek H, et al. Mobilization and transduction of CD34(+) peripheral blood stem cells in patients with X-linked chronic granulomatous disease. *J Hematother Stem Cell Res*. août 2002;11(4):683-694.
189. Sekhsaria S, Gallin JI, Linton GF, Mallory RM, Mulligan RC, Malech HL. Peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of p47phox-deficient chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 août 1993;90(16):7446-7450.
190. Weil WM, Linton GF, Whiting-Theobald N, Vowells SJ, Rafferty SP, Li F, et al. Genetic correction of p67phox deficient chronic granulomatous disease using peripheral blood progenitor cells as a target for retrovirus mediated gene transfer. *Blood*. 1 mars 1997;89(5):1754-1761.
191. Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, Linton GF, Sekhsaria S, Vowells SJ, et al. Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 oct 1997;94(22):12133-12138.
192. Malech HL, Choi U, Brenner S. Progress toward effective gene therapy for chronic granulomatous disease. *Jpn J Infect Dis*. oct 2004;57(5):S27-28.
193. Barese CN, Goebel WS, Dinayer MC. Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Expert Opin Biol Ther*. sept 2004;4(9):1423-1434.
194. Ott MG, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*. avr 2006;12(4):401-409.
195. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, Kinner A, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med*. févr 2010;16(2):198-204.
196. Kang EM, Choi U, Theobald N, Linton G, Long Priel DA, Kuhns D, et al. Retrovirus gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease can achieve stable long-term correction of oxidase activity in peripheral blood neutrophils. *Blood*. 28 janv 2010;115(4):783-791.
197. Kang HJ, Bartholomae CC, Paruzynski A, Arens A, Kim S, Yu SS, et al. Retroviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease: results from phase I/II trial. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. nov 2011;19(11):2092-2101.
198. Roesler J, Brenner S, Bukovsky AA, Whiting-Theobald N, Dull T, Kelly M, et al. Third-generation, self-inactivating gp91(phox) lentivector corrects the oxidase defect in NOD/SCID mouse-repopulating peripheral blood-mobilized CD34+ cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood*. 15 déc 2002;100(13):4381-4390.
199. Grez M, Reichenbach J, Schwäble J, Seger R, Dinayer MC, Thrasher AJ. Gene therapy of chronic granulomatous disease: the engraftment dilemma. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. janv 2011;19(1):28-35.

200. Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams DA. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med.* août 1996;2(8):876-882.
201. Persons DA, Allay JA, Riberdy JM, Wersto RP, Donahue RE, Sorrentino BP, et al. Use of the green fluorescent protein as a marker to identify and track genetically modified hematopoietic cells. *Nat Med.* oct 1998;4(10):1201-1205.
202. Pawliuk R, Eaves CJ, Humphries RK. Sustained high-level reconstitution of the hematopoietic system by preselected hematopoietic cells expressing a transduced cell-surface antigen. *Hum Gene Ther.* 1 sept 1997;8(13):1595-1604.
203. Becker S, Wasser S, Hauses M, Hossle JP, Ott MG, Dinauer MC, et al. Correction of respiratory burst activity in X-linked chronic granulomatous cells to therapeutically relevant levels after gene transfer into bone marrow CD34+ cells. *Hum Gene Ther.* 20 juill 1998;9(11):1561-1570.
204. Sadat MA, Pech N, Saulnier S, Leroy BA, Hossle JP, Grez M, et al. Long-term high-level reconstitution of NADPH oxidase activity in murine X-linked chronic granulomatous disease using a bicistronic vector expressing gp91phox and a Delta LNGFR cell surface marker. *Hum Gene Ther.* 1 mai 2003;14(7):651-666.
205. Woods NB, Ooka A, Karlsson S. Development of gene therapy for hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Leukemia.* avr 2002;16(4):563-569.
206. Saulnier SO, Steinhoff D, Dinauer MC, Zufferey R, Trono D, Seger RA, et al. Lentivirus-mediated gene transfer of gp91phox corrects chronic granulomatous disease (CGD) phenotype in human X-CGD cells. *J Gene Med.* oct 2000;2(5):317-325.
207. Naumann N, De Ravin SS, Choi U, Moayeri M, Whiting-Theobald N, Linton GF, et al. Simian immunodeficiency virus lentivector corrects human X-linked chronic granulomatous disease in the NOD/SCID mouse xenograft. *Gene Ther.* nov 2007;14(21):1513-1524.
208. Barde I, Laurenti E, Verp S, Wiznerowicz M, Offner S, Viorneri A, et al. Lineage- and stage-restricted lentiviral vectors for the gene therapy of chronic granulomatous disease. *Gene Ther.* nov 2011;18(11):1087-1097.
209. Kaufmann KB, Brendel C, Suerth JD, Mueller-Kuller U, Chen-Wichmann L, Schwäble J, et al. Alpharetroviral vector-mediated gene therapy for X-CGD: functional correction and lack of aberrant splicing. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* mars 2013;21(3):648-661.
210. Stein S, Scholz S, Schwäble J, Sadat MA, Modlich U, Schultze-Strasser S, et al. From Bench to Bedside: Preclinical Evaluation of a Self-Inactivating Gammaretroviral Vector for the Gene Therapy of X-linked Chronic Granulomatous Disease. *Hum Gene Ther Clin Dev.* juin 2013;24(2):86-98.
211. Moreno-Carranza B, Gentsch M, Stein S, Schambach A, Santilli G, Rudolf E, et al. Transgene optimization significantly improves SIN vector titers, gp91phox expression and reconstitution of superoxide production in X-CGD cells. *Gene Ther.* janv 2009;16(1):111-118.
212. Brendel C, Hänseler W, Wohlgensinger V, Bianchi M, Tokmak S, Chen-Wichmann L, et al. Human miR223 promoter as a novel myelo-specific promoter for chronic granulomatous disease gene therapy. *Hum Gene Ther Methods.* juin 2013;24(3):151-159.
213. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature.* 9 juill 1981;292(5819):154-156.
214. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1981;78(12):7634-7638.
215. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science.* 11 juin 1998;282(5391):1145-1147.
216. O'Donoghue K, Fisk NM. Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* déc 2004;18(6):853-875.
217. Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med.* mai 2009;4(3):423-433.

218. Goldstein G, Toren A, Nagler A. Human umbilical cord blood biology, transplantation and plasticity. *Curr Med Chem*. 2006;13(11):1249-1259.
219. Briggs R, King TJ. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. mai 1952;38(5):455-463.
220. Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature*. 5 juill 1958;182(4627):64-65.
221. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 27 févr 1997;385(6619):810-813.
222. Lo Nigro A, Verfaillie CM. Multiple Paths to Reprogramming. In: Bhartiya D, éditeur. *Pluripotent Stem Cells* [Internet]. InTech; 2013 [cité 22 sept 2013]. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/pluripotent-stem-cells/multiple-paths-to-reprogramming>
223. Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, Nelson M, Sanger WG, Gokhale S, et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*. 22 nov 2007;450(7169):497-502.
224. Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. 6 juin 2013;153(6):1228-1238.
225. Noggle S, Fung H-L, Gore A, Martinez H, Satriani KC, Prosser R, et al. Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature*. 6 oct 2011;478(7367):70-75.
226. Thuan NV, Kishigami S, Wakayama T. How to improve the success rate of mouse cloning technology. *J Reprod Dev*. févr 2010;56(1):20-30.
227. Miller RA, Ruddle FH. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell*. sept 1976;9(1):45-55.
228. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol CB*. 2 oct 2001;11(19):1553-1558.
229. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*. 26 août 2005;309(5739):1369-1373.
230. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 4 juill 2002;418(6893):41-49.
231. Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green HL, et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science*. 1 févr 2002;295(5556):819.
232. Taranger CK, Noer A, Sørensen AL, Håkelién A-M, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell*. déc 2005;16(12):5719-5735.
233. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 25 août 2006;126(4):663-676.
234. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 30 nov 2007;131(5):861-872.
235. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 21 déc 2007;318(5858):1917-1920.
236. Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, et al. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circ Res*. 1 févr 2013;112(3):523-533.
237. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 19 juill 2007;448(7151):313-317.
238. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 19 juill 2007;448(7151):318-324.
239. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. 7 juin 2007;1(1):55-70.

240. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci.* févr 2008;105(8):2883-2888.
241. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* oct 2007;25(10):1177-1181.
242. Kim J, Chu J, Shen X, Wang J, Orkin SH. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell.* 21 mars 2008;132(6):1049-1061.
243. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell.* 23 sept 2005;122(6):947-956.
244. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 30 mai 2003;113(5):643-655.
245. Loh Y-H, Wu Q, Chew J-L, Vega VB, Zhang W, Chen X, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.* avr 2006;38(4):431-440.
246. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 7 juin 2007;1(1):39-49.
247. Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, Suemori H. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. *Oncogene.* 16 août 2007;26(38):5564-5576.
248. Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol.* nov 2005;7(11):1074-1082.
249. Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, et al. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol.* févr 2005;7(2):165-171.
250. Wei Z, Yang Y, Zhang P, Andrianakos R, Hasegawa K, Lyu J, et al. Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. *Stem Cells Dayt Ohio.* déc 2009;27(12):2969-2978.
251. Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creighton MP, et al. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature.* 3 déc 2009;462(7273):595-601.
252. Papp B, Plath K. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Res.* mars 2011;21(3):486-501.
253. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 2 juill 2010;7(1):51-63.
254. Smith ZD, Nachman I, Regev A, Meissner A. Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. *Nat Biotechnol.* mai 2010;28(5):521-526.
255. Egli D, Birkhoff G, Eggan K. Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juill 2008;9(7):505-516.
256. Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell.* 6 mars 2008;2(3):230-240.
257. Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell.* 21 août 2009;138(4):722-737.
258. González F, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet.* avr 2011;12(4):231-242.
259. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* nov 2008;26(11):1276-1284.
260. Chien Y, Liao Y-W, Liu D-M, Lin H-L, Chen S-J, Chen H-L, et al. Corneal repair by human corneal keratocyte-reprogrammed iPSCs and amphiphatic carboxymethyl-hexanoyl chitosan hydrogel. *Biomaterials.* nov 2012;33(32):8003-8016.
261. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science.* 1 août 2008;321(5889):699-702.

262. Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R, Hochedlinger K. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells Dayt Ohio*. oct 2008;26(10):2467-2474.
263. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*. 6 févr 2009;136(3):411-419.
264. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*. 18 avr 2008;133(2):250-264.
265. Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, et al. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 sept 2009;106(37):15720-15725.
266. Cai J, Li W, Su H, Qin D, Yang J, Zhu F, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biol Chem*. 9 avr 2010;285(15):11227-11234.
267. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodríguez-Pizà I, Vassena R, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell*. 2 oct 2009;5(4):353-357.
268. Dambrot C, van de Pas S, van Zijl L, Brändl B, Wang JW, Schali J, et al. Polycistronic lentivirus induced pluripotent stem cells from skin biopsies after long term storage, blood outgrowth endothelial cells and cells from milk teeth. *Differ Res Biol Divers*. févr 2013;85(3):101-109.
269. Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, et al. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet*. sept 2009;41(9):968-976.
270. Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 4 déc 2008;3(6):595-605.
271. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. août 2010;28(8):848-855.
272. Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol*. août 2009;27(8):743-745.
273. Liu P, Chen S, Li X, Qin L, Huang K, Wang L, et al. Low immunogenicity of neural progenitor cells differentiated from induced pluripotent stem cells derived from less immunogenic somatic cells. *PLoS One*. 2013;8(7):e69617.
274. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. janv 2008;26(1):101-106.
275. Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 10 janv 2008;2(1):10-12.
276. Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*. 31 juill 2008;454(7204):646-650.
277. Liao J, Wu Z, Wang Y, Cheng L, Cui C, Gao Y, et al. Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res*. mai 2008;18(5):600-603.
278. Lapasset L, Milhavet O, Prieur A, Besnard E, Babled A, Aït-Hamou N, et al. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev*. 1 nov 2011;25(21):2248-2253.
279. Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W, et al. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*. 6 nov 2008;3(5):475-479.

280. Tsubooka N, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Yamanaka S. Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech.* juin 2009;14(6):683-694.
281. Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 11 sept 2008;3(3):340-345.
282. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature.* 3 juill 2008;454(7200):49-55.
283. Papapetrou EP, Tomishima MJ, Chambers SM, Mica Y, Reed E, Menon J, et al. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 août 2009;106(31):12759-12764.
284. Liao B, Bao X, Liu L, Feng S, Zovoilis A, Liu W, et al. MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. *J Biol Chem.* 13 mai 2011;286(19):17359-17364.
285. Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell.* 3 juin 2011;8(6):633-638.
286. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell.* 8 avr 2011;8(4):376-388.
287. Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol.* juill 2008;26(7):795-797.
288. Feng B, Ng J-H, Heng J-CD, Ng H-H. Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 3 avr 2009;4(4):301-312.
289. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol.* nov 2008;26(11):1269-1275.
290. Shi Y, Do JT, Desponts C, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 5 juin 2008;2(6):525-528.
291. Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, et al. A small-molecule inhibitor of tgfbeta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell.* 6 nov 2009;5(5):491-503.
292. Li W, Ding S. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends Pharmacol Sci.* janv 2010;31(1):36-45.
293. Panopoulos AD, Ruiz S, Yi F, Herréras A, Batchelder EM, Izpisua Belmonte JC. Rapid and highly efficient generation of induced pluripotent stem cells from human umbilical vein endothelial cells. *PLoS One.* 2011;6(5):e19743.
294. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* 21 oct 2008;6(10):e253.
295. Yu J, Chau KF, Vodyanik MA, Jiang J, Jiang Y. Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules. *PLoS One.* 2011;6(3):e17557.
296. Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, et al. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res.* janv 2011;21(1):196-204.
297. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature.* 27 août 2009;460(7259):1132-1135.
298. Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature.* 27 août 2009;460(7259):1140-1144.
299. Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, et al. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods.* nov 2009;6(11):805-808.
300. Desponts C, Ding S. Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2010;636:207-218.

301. Shi Y, Despons C, Do JT, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*. 6 nov 2008;3(5):568-574.
302. Chung T-L, Brena RM, Kolle G, Grimmond SM, Berman BP, Laird PW, et al. Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. oct 2010;28(10):1848-1855.
303. Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 8 janv 2010;6(1):71-79.
304. Oh S-I, Lee CK, Cho KJ, Lee K-O, Cho S-G, Hong S. Technological progress in generation of induced pluripotent stem cells for clinical applications. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:417809.
305. Antony-Debré I, Hamidi S, Norol F, Vainchenker W, Raslova H. Cellules souches pluripotentes induites : de l'historique à l'application. *Hématologie*. 2013;19:20-32.
306. Zhang Z, Gao Y, Gordon A, Wang ZZ, Qian Z, Wu W-S. Efficient generation of fully reprogrammed human iPS cells via polycistronic retroviral vector and a new cocktail of chemical compounds. *PloS One*. 2011;6(10):e26592.
307. Blelloch R, Venere M, Yen J, Ramalho-Santos M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell*. 13 sept 2007;1(3):245-247.
308. Hockemeyer D, Soldner F, Cook EG, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R. A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 11 sept 2008;3(3):346-353.
309. Wernig M, Lengner CJ, Hanna J, Lodato MA, Steine E, Foreman R, et al. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol*. août 2008;26(8):916-924.
310. Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, Saha K, Gao Q, Mitalipova M, et al. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 janv 2009;106(1):157-162.
311. Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells Dayt Ohio*. mars 2009;27(3):543-549.
312. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 9 avr 2009;458(7239):771-775.
313. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 6 mars 2009;136(5):964-977.
314. Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, Christodoulou C, Thomas DD, Gostissa M, et al. Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells Dayt Ohio*. janv 2010;28(1):64-74.
315. Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods*. mai 2009;6(5):363-369.
316. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Härmäläinen R, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 9 avr 2009;458(7239):766-770.
317. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 7 nov 2008;322(5903):945-949.
318. Zhou W, Freed CR. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. nov 2009;27(11):2667-2674.
319. Li HO, Zhu YF, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, et al. A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J Virol*. juill 2000;74(14):6564-6569.
320. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2009;85(8):348-362.

321. Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*. 2 juill 2010;7(1):11-14.
322. Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, et al. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 août 2011;108(34):14234-14239.
323. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 7 nov 2008;322(5903):949-953.
324. Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc*. mars 2010;5(3):418-428.
325. Gonzalez F, Barragan Monasterio M, Tiscornia G, Montserrat Pulido N, Vassena R, Batlle Morera L, et al. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 juin 2009;106(22):8918-8922.
326. Si-Tayeb K, Noto FK, Sepac A, Sedlic F, Bosnjak ZJ, Lough JW, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Dev Biol*. 2010;10:81.
327. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 8 mai 2009;324(5928):797-801.
328. Hu K, Yu J, Suknuntha K, Tian S, Montgomery K, Choi K-D, et al. Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. *Blood*. 7 avr 2011;117(14):e109-119.
329. Münz C, Bickham KL, Subklewe M, Tsang ML, Chahroudi A, Kurilla MG, et al. Human CD4(+) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1. *J Exp Med*. 15 mai 2000;191(10):1649-1660.
330. Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods*. mars 2010;7(3):197-199.
331. Narsinh KH, Jia F, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protoc*. janv 2011;6(1):78-88.
332. Ye L, Chang JC, Lin C, Qi Z, Yu J, Kan YW. Generation of induced pluripotent stem cells using site-specific integration with phage integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 nov 2010;107(45):19467-19472.
333. Hiratsuka M, Uno N, Ueda K, Kurosaki H, Imaoka N, Kazuki K, et al. Integration-free iPS cells engineered using human artificial chromosome vectors. *PloS One*. 2011;6(10):e25961.
334. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh Y-H, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 5 nov 2010;7(5):618-630.
335. Yakubov E, Rechavi G, Rozenblatt S, Givol D. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 26 mars 2010;394(1):189-193.
336. Yoshioka N, Gros E, Li H-R, Kumar S, Deacon DC, Maron C, et al. Efficient Generation of Human iPSCs by a Synthetic Self-Replicative RNA. *Cell Stem Cell*. 1 août 2013;13(2):246-254.
337. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 8 mai 2009;4(5):381-384.
338. Kim D, Kim C-H, Moon J-I, Chung Y-G, Chang M-Y, Han B-S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 5 juin 2009;4(6):472-476.
339. Zhang H, Ma Y, Gu J, Liao B, Li J, Wong J, et al. Reprogramming of somatic cells via TAT-mediated protein transduction of recombinant factors. *Biomaterials*. juill 2012;33(20):5047-5055.
340. Okada M, Oka M, Yoneda Y. Effective culture conditions for the induction of pluripotent stem cells. *Biochim Biophys Acta*. sept 2010;1800(9):956-963.

341. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 4 sept 2009;5(3):237-241.
342. Lai W-H, Ho JC-Y, Lee Y-K, Ng K-M, Au K-W, Chan Y-C, et al. ROCK inhibition facilitates the generation of human-induced pluripotent stem cells in a defined, feeder-, and serum-free system. *Cell Reprogramming*. déc 2010;12(6):641-653.
343. Van der Sanden B, Dhobb M, Berger F, Wion D. Optimizing stem cell culture. *J Cell Biochem*. 1 nov 2010;111(4):801-807.
344. Villa-Diaz LG, Ross AM, Lahann J, Krebsbach PH. Concise review: The evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells Dayt Ohio*. janv 2013;31(1):1-7.
345. Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods*. mai 2011;8(5):424-429.
346. Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol*. févr 2006;24(2):185-187.
347. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. 15 déc 1988;336(6200):684-687.
348. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. juin 2007;25(6):681-686.
349. Xu Y, Zhu X, Hahm HS, Wei W, Hao E, Hayek A, et al. Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 mai 2010;107(18):8129-8134.
350. Hongisto H, Vuoristo S, Mikhailova A, Suuronen R, Virtanen I, Otonkoski T, et al. Laminin-511 expression is associated with the functionality of feeder cells in human embryonic stem cell culture. *Stem Cell Res*. janv 2012;8(1):97-108.
351. Pan C, Hicks A, Guan X, Chen H, Bishop CE. SNL fibroblast feeder layers support derivation and maintenance of human induced pluripotent stem cells. *J Genet Genomics Yi Chuan Xue Bao*. avr 2010;37(4):241-248.
352. Stacey GN, Cobo F, Nieto A, Talavera P, Healy L, Concha A. The development of « feeder » cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: challenges and solutions. *J Biotechnol*. 1 oct 2006;125(4):583-588.
353. Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med*. févr 2005;11(2):228-232.
354. Kibschull M, Mileikovsky M, Michael IP, Lye SJ, Nagy A. Human embryonic fibroblasts support single cell enzymatic expansion of human embryonic stem cells in xeno-free cultures. *Stem Cell Res*. janv 2011;6(1):70-82.
355. Richards M, Tan S, Fong C-Y, Biswas A, Chan W-K, Bongso A. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2003;21(5):546-556.
356. Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod*. juin 2003;68(6):2150-2156.
357. Inzunza J, Gertow K, Strömberg MA, Matilainen E, Blennow E, Skottman H, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. avr 2005;23(4):544-549.
358. Unger C, Gao S, Cohen M, Jaconi M, Bergstrom R, Holm F, et al. Immortalized human skin fibroblast feeder cells support growth and maintenance of both human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum Reprod Oxf Engl*. oct 2009;24(10):2567-2581.

359. Tecirlioglu RT, Nguyen L, Koh K, Trounson AO, Michalska AE. Derivation and maintenance of human embryonic stem cell line on human adult skin fibroblast feeder cells in serum replacement medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* avr 2010;46(3-4):231-235.
360. Park Y, Kim JH, Lee SJ, Choi IY, Park SJ, Lee SR, et al. Human feeder cells can support the undifferentiated growth of human and mouse embryonic stem cells using their own basic fibroblast growth factors. *Stem Cells Dev.* nov 2011;20(11):1901-1910.
361. Zhang L, Zheng W, Wang Y, Wang Y, Huang H. Human bone marrow mesenchymal stem cells support the derivation and propagation of human induced pluripotent stem cells in culture. *Cell Reprogramming.* juin 2013;15(3):216-223.
362. Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, Brunette E, Powell S, Nath A, et al. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil Steril.* mai 2005;83(5):1517-1529.
363. Park Y, Lee SJ, Choi IY, Lee SR, Sung HJ, Kim JH, et al. The efficacy of human placenta as a source of the universal feeder in human and mouse pluripotent stem cell culture. *Cell Reprogramming.* juin 2010;12(3):315-328.
364. Rodríguez-Pizà I, Richaud-Patin Y, Vassena R, González F, Barrero MJ, Veiga A, et al. Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions. *Stem Cells Dayt Ohio.* janv 2010;28(1):36-44.
365. Takahashi K, Narita M, Yokura M, Ichisaka T, Yamanaka S. Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders. *PLoS ONE.* 2009;4(12):e8067.
366. Sugii S, Kida Y, Kawamura T, Suzuki J, Vassena R, Yin Y-Q, et al. Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 févr 2010;107(8):3558-3563.
367. Eiselleova L, Peterkova I, Neradil J, Slaninova I, Hampl A, Dvorak P. Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int J Dev Biol.* 2008;52(4):353-363.
368. Jozefczuk J, Drews K, Adjaye J. Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. *J Vis Exp JoVE.* 2012;(64).
369. Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, et al. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry (Mosc).* 28 janv 1986;25(2):312-318.
370. Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry (Mosc).* 23 nov 1982;21(24):6188-6193.
371. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* oct 2001;19(10):971-974.
372. Ludwig TE, Bergendahl V, Levenstein ME, Yu J, Probasco MD, Thomson JA. Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat Methods.* août 2006;3(8):637-646.
373. Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod.* mars 2004;70(3):837-845.
374. Miyazaki T, Futaki S, Hasegawa K, Kawasaki M, Sanzen N, Hayashi M, et al. Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 10 oct 2008;375(1):27-32.
375. Rodin S, Domogatskaya A, Ström S, Hansson EM, Chien KR, Inzunza J, et al. Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511. *Nat Biotechnol.* juin 2010;28(6):611-615.
376. Braam SR, Zeinstra L, Litjens S, Ward-van Oostwaard D, van den Brink S, van Laake L, et al. Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via α 5 β 1 integrin. *Stem Cells Dayt Ohio.* sept 2008;26(9):2257-2265.
377. Kim H-T, Lee K-I, Kim D-W, Hwang D-Y. An ECM-based culture system for the generation and maintenance of xeno-free human iPS cells. *Biomaterials.* janv 2013;34(4):1041-1050.

378. Moody J. Feeder-independent culture systems for human pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013;946:507-521.
379. Li L, Bennett SAL, Wang L. Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adhes Migr*. févr 2012;6(1):59-70.
380. Nagaoka M, Si-Tayeb K, Akaike T, Duncan SA. Culture of human pluripotent stem cells using completely defined conditions on a recombinant E-cadherin substratum. *BMC Dev Biol*. 2010;10:60.
381. Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, et al. Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS One*. 2010;5(11):e14099.
382. Brafman DA, Chang CW, Fernandez A, Willert K, Varghese S, Chien S. Long-term human pluripotent stem cell self-renewal on synthetic polymer surfaces. *Biomaterials*. déc 2010;31(34):9135-9144.
383. Klim JR, Li L, Wrighton PJ, Piekarczyk MS, Kiessling LL. A defined glycosaminoglycan-binding substratum for human pluripotent stem cells. *Nat Methods*. déc 2010;7(12):989-994.
384. Mei Y, Saha K, Bogatyrev SR, Yang J, Hook AL, Kalciglu ZI, et al. Combinatorial development of biomaterials for clonal growth of human pluripotent stem cells. *Nat Mater*. sept 2010;9(9):768-778.
385. Melkounian Z, Weber JL, Weber DM, Fadeev AG, Zhou Y, Dolley-Sonneville P, et al. Synthetic peptide-acrylate surfaces for long-term self-renewal and cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. juin 2010;28(6):606-610.
386. Li YJ, Chung EH, Rodriguez RT, Firpo MT, Healy KE. Hydrogels as artificial matrices for human embryonic stem cell self-renewal. *J Biomed Mater Res A*. oct 2006;79(1):1-5.
387. Irwin EF, Gupta R, Dashti DC, Healy KE. Engineered polymer-media interfaces for the long-term self-renewal of human embryonic stem cells. *Biomaterials*. oct 2011;32(29):6912-6919.
388. Nandivada H, Villa-Diaz LG, O'Shea KS, Smith GD, Krebsbach PH, Lahann J. Fabrication of synthetic polymer coatings and their use in feeder-free culture of human embryonic stem cells. *Nat Protoc*. juill 2011;6(7):1037-1043.
389. Villa-Diaz LG, Nandivada H, Ding J, Nogueira-de-Souza NC, Krebsbach PH, O'Shea KS, et al. Synthetic polymer coatings for long-term growth of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. juin 2010;28(6):581-583.
390. Deng Y, Zhang X, Zhao X, Li Q, Ye Z, Li Z, et al. Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on peptide-decorated poly(OEGMA-co-HEMA) brushes under fully defined conditions. *Acta Biomater*. 24 juill 2013;
391. Liu Y, Charles LF, Zarembinski TI, Johnson KI, Atzet SK, Wesselschmidt RL, et al. Modified hyaluronan hydrogels support the maintenance of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Macromol Biosci*. août 2012;12(8):1034-1042.
392. Jin S, Yao H, Weber JL, Melkounian ZK, Ye K. A synthetic, xeno-free peptide surface for expansion and directed differentiation of human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2012;7(11):e50880.
393. Kshitiz, Kim D-H, Beebe DJ, Levchenko A. Micro- and nanoengineering for stem cell biology: the promise with a caution. *Trends Biotechnol*. août 2011;29(8):399-408.
394. Sun Y, Weng S, Fu J. Microengineered synthetic cellular microenvironment for stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. août 2012;4(4):414-427.
395. Chen AK, Chen X, Choo ABH, Reuveny S, Oh SKW. Expansion of human embryonic stem cells on cellulose microcarriers. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. sept 2010;Chapter 1:Unit 1C.11.
396. Phillips BW, Horne R, Lay TS, Rust WL, Teck TT, Crook JM. Attachment and growth of human embryonic stem cells on microcarriers. *J Biotechnol*. 6 nov 2008;138(1-2):24-32.
397. Storm MP, Orchard CB, Bone HK, Chaudhuri JB, Welham MJ. Three-dimensional culture systems for the expansion of pluripotent embryonic stem cells. *Biotechnol Bioeng*. 1 nov 2010;107(4):683-695.

398. Amit M, Chebath J, Margulets V, Laevsky I, Miropolsky Y, Shariki K, et al. Suspension culture of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev.* juin 2010;6(2):248-259.
399. Olmer R, Haase A, Merkert S, Cui W, Palecek J, Ran C, et al. Long term expansion of undifferentiated human iPS and ES cells in suspension culture using a defined medium. *Stem Cell Res.* juill 2010;5(1):51-64.
400. Steiner D, Khaner H, Cohen M, Even-Ram S, Gil Y, Itsykson P, et al. Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. *Nat Biotechnol.* avr 2010;28(4):361-364.
401. Zweigerdt R, Olmer R, Singh H, Haverich A, Martin U. Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture. *Nat Protoc.* mai 2011;6(5):689-700.
402. Fluri DA, Tonge PD, Song H, Baptista RP, Shakiba N, Shukla S, et al. Derivation, expansion and differentiation of induced pluripotent stem cells in continuous suspension cultures. *Nat Methods.* mai 2012;9(5):509-516.
403. Abbasalizadeh S, Larijani MR, Samadian A, Baharvand H. Bioprocess development for mass production of size-controlled human pluripotent stem cell aggregates in stirred suspension bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods.* nov 2012;18(11):831-851.
404. Kehoe DE, Jing D, Lock LT, Tzanakakis ES. Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells. *Tissue Eng Part A.* févr 2010;16(2):405-421.
405. Olmer R, Lange A, Selzer S, Kasper C, Haverich A, Martin U, et al. Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors. *Tissue Eng Part C Methods.* oct 2012;18(10):772-784.
406. Csete M. Oxygen in the cultivation of stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* mai 2005;1049:1-8.
407. Wion D, Christen T, Barbier EL, Coles JA. PO(2) matters in stem cell culture. *Cell Stem Cell.* 4 sept 2009;5(3):242-243.
408. Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29 mars 2005;102(13):4783-4788.
409. Westfall SD, Sachdev S, Das P, Hearne LB, Hannink M, Roberts RM, et al. Identification of oxygen-sensitive transcriptional programs in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* oct 2008;17(5):869-881.
410. Lu H-E, Tsai M-S, Yang Y-C, Yuan C-C, Wang T-H, Lin X-Z, et al. Selection of alkaline phosphatase-positive induced pluripotent stem cells from human amniotic fluid-derived cells by feeder-free system. *Exp Cell Res.* 1 août 2011;317(13):1895-1903.
411. Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature.* 19 janv 2012;481(7381):295-305.
412. Zhao X, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature.* 3 sept 2009;461(7260):86-90.
413. Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, Rodriguez AR, Gifford W, Martin G, et al. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature.* 3 sept 2009;461(7260):91-94.
414. Liang G, Zhang Y. Genetic and Epigenetic Variations in iPSCs: Potential Causes and Implications for Application. *Cell Stem Cell.* 1 août 2013;13(2):149-159.
415. International Stem Cell Initiative, Amps K, Andrews PW, Anyfantis G, Armstrong L, Avery S, et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol.* déc 2011;29(12):1132-1144.
416. Taapken SM, Nisler BS, Newton MA, Sampsell-Barron TL, Leonhard KA, McIntire EM, et al. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* avr 2011;29(4):313-314.
417. Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti J-C, Yakir B, Clark AT, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 8 oct 2010;7(4):521-531.
418. Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* janv 2004;22(1):53-54.

419. Park I-H, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 5 sept 2008;134(5):877-886.
420. Abyzov A, Mariani J, Palejev D, Zhang Y, Haney MS, Tomasini L, et al. Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature*. 20 déc 2012;492(7429):438-442.
421. Freedman BS, Lam AQ, Sundsbak JL, Iatrino R, Su X, Koon SJ, et al. Reduced Ciliary Polycystin-2 in Induced Pluripotent Stem Cells from Polycystic Kidney Disease Patients with PKD1 Mutations. *J Am Soc Nephrol JASN*. 5 sept 2013;
422. Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R, et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*. 7 janv 2011;8(1):106-118.
423. Lefort N, Feyeux M, Bas C, Féraud O, Bennaceur-Griscelli A, Tachdjian G, et al. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol*. déc 2008;26(12):1364-1366.
424. Martins-Taylor K, Xu R-H. Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. janv 2012;30(1):22-27.
425. Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Närvä E, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*. 3 mars 2011;471(7336):58-62.
426. Cheng L, Hansen NF, Zhao L, Du Y, Zou C, Donovan FX, et al. Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell*. 2 mars 2012;10(3):337-344.
427. Gore A, Li Z, Fung H-L, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 3 mars 2011;471(7336):63-67.
428. Young MA, Larson DE, Sun C-W, George DR, Ding L, Miller CA, et al. Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 4 mai 2012;10(5):570-582.
429. Ruiz S, Gore A, Li Z, Panopoulos AD, Montserrat N, Fung H-L, et al. Analysis of protein-coding mutations in hiPSCs and their possible role during somatic cell reprogramming. *Nat Commun*. 2013;4:1382.
430. Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, Lim SM, et al. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell*. 21 déc 2012;151(7):1617-1632.
431. Bar-Nur O, Russ HA, Efrat S, Benvenisty N. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell*. 8 juill 2011;9(1):17-23.
432. Ruiz S, Diep D, Gore A, Panopoulos AD, Montserrat N, Plongthongkum N, et al. Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 oct 2012;109(40):16196-16201.
433. Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, et al. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol*. mai 2011;13(5):541-549.
434. Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, et al. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. déc 2011;29(12):1117-1119.
435. Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, et al. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell*. 4 févr 2011;144(3):439-452.
436. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 3 mars 2011;471(7336):68-73.
437. Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, et al. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet*. mai 2011;7(5):e1002085.

438. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, et al. Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell*. 2 juill 2009;5(1):111-123.
439. Doi A, Park I-H, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet*. déc 2009;41(12):1350-1353.
440. Nazor KL, Altun G, Lynch C, Tran H, Harness JV, Slavin I, et al. Recurrent variations in DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives. *Cell Stem Cell*. 4 mai 2012;10(5):620-634.
441. Pick M, Stelzer Y, Bar-Nur O, Mayshar Y, Eden A, Benvenisty N. Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. nov 2009;27(11):2686-2690.
442. Pomp O, Dreesen O, Leong DFM, Meller-Pomp O, Tan TT, Zhou F, et al. Unexpected X chromosome skewing during culture and reprogramming of human somatic cells can be alleviated by exogenous telomerase. *Cell Stem Cell*. 5 août 2011;9(2):156-165.
443. Silva SS, Rowntree RK, Mekhoubad S, Lee JT. X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 mars 2008;105(12):4820-4825.
444. Anguera MC, Sadreyev R, Zhang Z, Szanto A, Payer B, Sheridan SD, et al. Molecular signatures of human induced pluripotent stem cells highlight sex differences and cancer genes. *Cell Stem Cell*. 6 juill 2012;11(1):75-90.
445. Tomoda K, Takahashi K, Leung K, Okada A, Narita M, Yamada NA, et al. Derivation conditions impact X-inactivation status in female human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 6 juill 2012;11(1):91-99.
446. Cheung AYL, Horvath LM, Carrel L, Ellis J. X-chromosome inactivation in rett syndrome human induced pluripotent stem cells. *Front Psychiatry*. 2012;3:24.
447. Panopoulos AD, Ruiz S, Izpisua Belmonte JC. iPSCs: induced back to controversy. *Cell Stem Cell*. 8 avr 2011;8(4):347-348.
448. Choi K-D, Vodnyanik MA, Slukvin II. Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors. *J Clin Invest*. sept 2009;119(9):2818-2829.
449. Di Pasquale E, Song B, Condorelli G. Generation of human cardiomyocytes: a differentiation protocol from feeder-free human induced pluripotent stem cells. *J Vis Exp JoVE*. 2013;(76).
450. Theka I, Caiazzo M, Dvoretzskova E, Leo D, Ungaro F, Curreli S, et al. Rapid generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells through a single-step procedure using cell lineage transcription factors. *Stem Cells Transl Med*. juin 2013;2(6):473-479.
451. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *HepatoL Baltim Md*. janv 2010;51(1):297-305.
452. Chen Y-F, Tseng C-Y, Wang H-W, Kuo H-C, Yang VW, Lee OK. Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol. *HepatoL Baltim Md*. avr 2012;55(4):1193-1203.
453. Mekala SR, Vauhini V, Nagarajan U, Maddileti S, Gaddipati S, Mariappan I. Derivation, characterization and retinal differentiation of induced pluripotent stem cells. *J Biosci*. mars 2013;38(1):123-134.
454. Wernig M, Zhao J-P, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 avr 2008;105(15):5856-5861.
455. Jeon K, Lim H, Kim J-H, Thuan NV, Park SH, Lim Y-M, et al. Differentiation and transplantation of functional pancreatic beta cells generated from induced pluripotent stem cells derived from a type 1 diabetes mouse model. *Stem Cells Dev*. 20 sept 2012;21(14):2642-2655.

456. Lu T-Y, Lin B, Kim J, Sullivan M, Tobita K, Salama G, et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nat Commun.* 14 août 2013;4:2307.
457. Liu H, Kim Y, Sharkis S, Marchionni L, Jang Y-Y. In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Sci Transl Med.* 11 mai 2011;3(82):82ra39.
458. Nakamura M, Okano H. Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells. *Cell Res.* janv 2013;23(1):70-80.
459. Ebihara Y, Ma F, Tsuji K. Generation of red blood cells from human embryonic/induced pluripotent stem cells for blood transfusion. *Int J Hematol.* juin 2012;95(6):610-616.
460. Lapillonne H, Kobari L, Mazurier C, Tropel P, Giarratana M-C, Zanella-Cleon I, et al. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica.* oct 2010;95(10):1651-1659.
461. Takayama N, Eto K. In vitro generation of megakaryocytes and platelets from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;788:205-217.
462. Nakagawa Y, Nakamura S, Nakajima M, Endo H, Dohda T, Takayama N, et al. Two differential flows in a bioreactor promoted platelet generation from human pluripotent stem cell-derived megakaryocytes. *Exp Hematol.* août 2013;41(8):742-748.
463. Peyrard T, Bardiaux L, Krause C, Kobari L, Lapillonne H, Andreu G, et al. Banking of pluripotent adult stem cells as an unlimited source for red blood cell production: potential applications for alloimmunized patients and rare blood challenges. *Transfus Med Rev.* juill 2011;25(3):206-216.
464. Amabile G, Welner RS, Nombela-Arrieta C, D'Alise AM, Di Ruscio A, Ebralidze AK, et al. In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. *Blood.* 21 févr 2013;121(8):1255-1264.
465. Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Okabe M, Masaki H, Takaki S, et al. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* juill 2013;21(7):1424-1431.
466. Anson BD, Kolaja KL, Kamp TJ. Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology. *Clin Pharmacol Ther.* mai 2011;89(5):754-758.
467. Tanaka T, Tohyama S, Murata M, Nomura F, Kaneko T, Chen H, et al. In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 7 août 2009;385(4):497-502.
468. Wobus AM, Löser P. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research. *Arch Toxicol.* févr 2011;85(2):79-117.
469. Ulvestad M, Nordell P, Asplund A, Rehnström M, Jacobsson S, Holmgren G, et al. Drug metabolizing enzyme and transporter protein profiles of hepatocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biochem Pharmacol.* 1 sept 2013;86(5):691-702.
470. Heuer J, Bremer S, Pohl I, Spielmann H. Development of an in vitro embryotoxicity test using murine embryonic stem cell cultures. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* juill 1993;7(4):551-556.
471. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science.* 29 août 2008;321(5893):1218-1221.
472. Ye Z, Zhan H, Mali P, Dowey S, Williams DM, Jang Y-Y, et al. Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood.* 24 déc 2009;114(27):5473-5480.
473. Ye L, Chang JC, Lin C, Sun X, Yu J, Kan YW. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 juin 2009;106(24):9826-9830.

474. Marchetto MCN, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 12 nov 2010;143(4):527-539.
475. Phillips BW, Crook JM. Pluripotent human stem cells: A novel tool in drug discovery. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther*. 1 avr 2010;24(2):99-108.
476. Rowntree RK, McNeish JD. Induced pluripotent stem cells: opportunities as research and development tools in 21st century drug discovery. *Regen Med*. juill 2010;5(4):557-568.
477. Collin J, Lako M. Concise review: putting a finger on stem cell biology: zinc finger nuclease-driven targeted genetic editing in human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. juill 2011;29(7):1021-1033.
478. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. oct 2010;186(2):757-761.
479. Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2 juill 2009;460(7251):53-59.
480. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun C-W, Meissner A, Cassady JP, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 21 déc 2007;318(5858):1920-1923.
481. Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, Haddad B, Khayter C, Yeo DT, et al. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells Dayt Ohio*. nov 2011;29(11):1717-1726.
482. Zou J, Mali P, Huang X, Doney SN, Cheng L. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood*. 27 oct 2011;118(17):4599-4608.
483. Sun N, Zhao H. Seamless correction of the sickle cell disease mutation of the HBB gene in human induced pluripotent stem cells using TALENs. *Biotechnol Bioeng*. 8 août 2013;
484. Lieber JG, Webb S, Suratt BT, Young SK, Johnson GL, Keller GM, et al. The in vitro production and characterization of neutrophils from embryonic stem cells. *Blood*. 1 févr 2004;103(3):852-859.
485. Saeki K, Saeki K, Nakahara M, Matsuyama S, Nakamura N, Yogiashi Y, et al. A feeder-free and efficient production of functional neutrophils from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. janv 2009;27(1):59-67.
486. Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, et al. Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood*. 25 juin 2009;113(26):6584-6592.
487. Mukherjee S, Santilli G, Blundell MP, Navarro S, Bueren JA, Thrasher AJ. Generation of Functional Neutrophils from a Mouse Model of X-Linked Chronic Granulomatous Disorder Using Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE*. 3 mars 2011;6(3):e17565.
488. Zou J, Sweeney CL, Chou B-K, Choi U, Pan J, Wang H, et al. Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood*. 26 mai 2011;117(21):5561-5572.
489. Jiang Y, Cowley SA, Siler U, Melguizo D, Tilgner K, Browne C, et al. Derivation and functional analysis of patient-specific induced pluripotent stem cells as an in vitro model of chronic granulomatous disease. *Stem Cells Dayt Ohio*. avr 2012;30(4):599-611.
490. Karlsson KR, Cowley S, Martinez FO, Shaw M, Minger SL, James W. Homogeneous monocytes and macrophages from human embryonic stem cells following coculture-free differentiation in M-CSF and IL-3. *Exp Hematol*. sept 2008;36(9):1167-1175.
491. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*. avr 2011;11(4):268-277.
492. Lee M-O, Moon SH, Jeong H-C, Yi J-Y, Lee T-H, Shim SH, et al. Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 août 2013;

493. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med Camb Mass*. févr 2000;6(2):88-95.
494. Cherry ABC, Daley GQ. Reprogrammed cells for disease modeling and regenerative medicine. *Annu Rev Med*. 2013;64:277-290.
495. Müller F-J, Goldmann J, Löser P, Loring JF. A call to standardize teratoma assays used to define human pluripotent cell lines. *Cell Stem Cell*. 7 mai 2010;6(5):412-414.
496. Dolgin E. Putting stem cells to the test. *Nat Med*. déc 2010;16(12):1354-1357.
497. Buta C, David R, Dressel R, Engård M, Fuchs C, Gross U, et al. Reconsidering pluripotency tests: do we still need teratoma assays? *Stem Cell Res*. juill 2013;11(1):552-562.
498. Gertow K, Przyborski S, Loring JF, Auerbach JM, Epifano O, Otonkoski T, et al. Isolation of human embryonic stem cell-derived teratomas for the assessment of pluripotency. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. oct 2007;Chapter 1:Unit1B.4.
499. Sheridan SD, Surampudi V, Rao RR. Analysis of embryoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells as a means to assess pluripotency. *Stem Cells Int*. 2012;2012:738910.
500. Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng*. mai 2007;103(5):389-398.
501. Cameron CM, Hu W-S, Kaufman DS. Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation. *Biotechnol Bioeng*. 5 août 2006;94(5):938-948.
502. Gerecht-Nir S, Cohen S, Itskovitz-Eldor J. Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation. *Biotechnol Bioeng*. 5 juin 2004;86(5):493-502.
503. Carpenedo RL, Sargent CY, McDevitt TC. Rotary suspension culture enhances the efficiency, yield, and homogeneity of embryoid body differentiation. *Stem Cells Dayt Ohio*. sept 2007;25(9):2224-2234.
504. Ng ES, Davis RP, Azzola L, Stanley EG, Elefanty AG. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood*. 1 sept 2005;106(5):1601-1603.
505. Ezekiel UR, Muthuchamy M, Ryerse JS, Heuertz RM. Single embryoid body formation in a multi-well plate. *Electron J Biotechnol*. avr 2007;10(2):328-335.
506. Ungrin MD, Joshi C, Nica A, Bauwens C, Zandstra PW. Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PLoS One*. 2008;3(2):e1565.
507. Cerdan C, Hong SH, Bhatia M. Formation and hematopoietic differentiation of human embryoid bodies by suspension and hanging drop cultures. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. oct 2007;Chapter 1:Unit 1D.2.
508. Lund RJ, Nikula T, Rahkonen N, Närvä E, Baker D, Harrison N, et al. High-throughput karyotyping of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. nov 2012;9(3):192-195.
509. Choi K-D, Vodyanik M, Slukvin II. Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. mars 2011;6(3):296-313.

ANNEXES

**42nd Annual Scientific Meeting of the
ISEH – Society for Hematology and Stem Cells**

Thursday 22 August – Sunday 25 August 2013

The Imperial Riding School Renaissance Hotel

Vienna, Austria

P1021 - DECLINED PRESENTATION**NOVEL FUNCTIONAL ROLES FOR TEN-ELEVEN-TRANSLOCATION 2 (TET2) IN NORMAL AND LEUKEMIC GROWTH OF MAST CELLS**Raghavvar Mali¹, Valeria Visconte², Tiu Ramon², Helmut Hanenberg¹, Mingliang Xu¹, and Reuben Kapur¹¹Department of Pediatrics, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA; ²Translational Hematology and Oncology Research, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio, USA

Mast cells play a vital role in innate and adaptive immunity. KIT receptor signaling is essential for mast cell growth and survival. Gain-of-function mutations in KIT receptor have been identified in humans in 90% of systemic mastocytosis (SM) patients. KITD816V mutation found in SM is imatinib-resistant and current anti-KIT therapies for KITD816V+ SM are ineffective. Our recent clinical studies have identified the presence of Tet2 mutations in 23% of mastocytosis patients and are associated with poor overall prognosis. However, the physiologic role(s) of Tet2 in normal mast cell development and cooperation between Tet2 and KITD816V mutations in SM are not well studied. In this study, we have determined the functional role of Tet2 in normal mast cell development and molecular mechanisms of cooperation between Tet2 and KITD816V mutations in SM. We found significantly increased number of immature mast cells in the peritoneal cavity of Tet2^{-/-} mice compared to WT mice in vivo. Bone marrow-derived mast cells (BMMCs) from Tet2^{-/-} mice show significant reduction in 5-hydroxymethyl cytosine levels compared to WT BMMCs. Tet2^{-/-} BMMCs show significant reduction in mast cell differentiation, reduced expression of mast cell-specific genes MCP-5, MCP-6 and CPA, and altered expression of key transcription factors Maf, Gata-2 and PU.1 compared to WT BMMCs. In addition, Tet2^{-/-} BMMCs show enhanced cytokine-induced growth and survival. Furthermore, Tet2^{-/-} murine or knocked down human cells bearing KIT mutation show significantly enhanced growth compared to cells bearing KIT mutation alone. Hyperproliferation of Tet2^{-/-} BMMCs in the presence and absence of KIT mutation is associated with reduced expression of Pten and enhanced activation of the PI3K/AKT pathway. Treatment with demethylating agent 5-azacytidine or PI3K inhibitor GDC-0941 (p110 α / β -specific), but not TGX221 (p110 β -specific) or ICS7114 (p110 δ -specific), significantly reduced the hyperproliferation of Tet2^{-/-} BMMCs and cell lines as well as primary BM blasts derived from mastocytosis patients bearing KITD816V mutation. Thus, combinatorial therapy involving both demethylating agent and PI3K inhibitor is likely to be ideal for treating SM patients with Tet2 and KIT mutations.

P1022 - OPTIMIZATION OF X-LINKED CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE MODELIZATION BY USING PATIENT-SPECIFIC INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLSJulie Brault^{1,2}, Erwan Goutagay^{1,2}, Tomo Saric³, Karl-Heinz Krause⁷, Marie-Josée Sasia^{1,2}, K. Shao³, M. Gupta³, D. Gruenewald⁴, Jp Brion⁵, and D. Plantaz⁶¹Centre Diagnostique et Recherche sur la granulomatose septique (CDiReC), Institut de Biologie et Pathologie, Grenoble, France; ²TherEx, TIMC/Imag, UMR CNRS 5525, Université Joseph Fourier, Grenoble, France; ³Institute for Neurophysiology, Cologne, Germany; ⁴IRTSV/BCI, CEA, Grenoble, France; ⁵CEA, Grenoble, France; ⁶Pôle de Médecine Aigue et Communautaire, Pôle Couple Enfant, Grenoble, France; ⁷Dept. of Pathology and Immunology, Pôle Couple Enfant, Grenoble, Switzerland

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are reprogrammed somatic cells with embryonic stem cell (ESC)-like characteristics generated by the introduction of combinations of specific transcription factors. Patient-specific iPSCs can be used to recapitulate disease-specific phenotypes for the screening of new therapies. Chronic granulomatous disease (CGD), a rare inherited immunodeficiency, is characterized by recurrent and severe infections in childhood. The most frequent form is the X-linked CGD (X-CGD) due to mutations in CYBB leading to the absence of Nox2 of the phagocytic NADPH oxidase complex, responsible for the production of microbicidal reactive oxygen species. Our objective was to optimize the generation of phagocytes reproducing the X-CGD physiopathology in order to test a new therapeutic approach based on protein therapy. X-CGD and control iPSC lines were reprogrammed from human fibroblasts with OSKM retroviral vectors. iPSC lines expressing pluripotency markers were able to form embryoid bodies (EBs) with the three embryonic germ layers. Hematopoietic differentiation induced after coculture of iPSCs or EBs with OP9 mouse bone marrow stromal cell line, was characterized by a fast decrease of pluripotency markers with a progressive appearance of CD34⁺ progenitors. Terminal differentiation into mature neutrophils or macrophages (5.10⁵ cells) was obtained in 10-14 days by using specific hematopoietic cytokines. No significant difference between both coculture types (iPSC or EB) was noticed. Freezing and thawing of the CD34⁺ progenitors did not modify the progenitor ability. X-CGD neutrophils and macrophages derived from X-CGD iPSCs showed no Nox2 expression and NADPH oxidase activity unlike control cells. In conclusion, we succeeded to generate a cellular model of X-CGD ready to test new therapeutic approaches.

P1023 - CONTROLLED GENERATION OF HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS FROM PLURIPOTENT STEM CELLS USING MICROENVIRONMENTAL CUESMuhammad Rahman¹, Patrick Brauer², Juan Zúñiga-Pflicke², and Peter Zandstra¹¹Institute of Biomaterials & Biomedical Engineering, University of Toronto, Downtown Toronto, Ontario, Canada; ²Sunnybrook Research Institute, Toronto, Ontario, Canada

Human pluripotent stem cells (hPSCs) have great potential for regenerative medicine due to their ability to develop into any of the somatic cells including blood cells. However, in vitro protocols for generating hPSC-derived hematopoietic progenitor cells (HPCs) utilize xenogeneic products, display low yields and typically generate primitive blood phenotypes. Current evidence suggests a homogenic endothelial (HE) population giving rise to definitive blood cells. Obtaining this population from hPSCs has been difficult since definitive hematopoiesis during embryogenesis is a dynamic and tightly controlled process. We hypothesize that hPSC-derived endothelial cells can be obtained using defined and controlled conditions and can be micropatterned into artificial niches to mimic blood forming HE. The AggreWell™ technology was used to generate variable aggregate sizes to culture PSCs towards HPCs in serum-free defined media. Expression of CD45 peaked by day 20 (35%) and colony forming cells from PSC-derived cells were highest on day 13 at 200 colonies/105 seeded cells. HE expression was assessed by tracking CD34+VECAD+CD43- which was highest on day 8. Thereafter, day 8 cells were sorted into CD34+VECAD+ and were positive for von Willebrand factor and uptake of low density lipoprotein confirming its endothelial nature. To assess if these cells can give rise to definitive-like blood cells, day 8 CD34+CD43- cells (29% expression pre-sort) were magnetically sorted and placed on non-irradiated OP9-DL1 cells for co-culture. By day 21 of co-culture, cells were 11% positive for CD5+CD7+ indicative of pro-T lymphoid cells thereby implicating their definitive potential. We have previously shown that precise control of colony size allows for the manipulation of hESC fate. Building on this, day 8 HE cells are currently being patterned as 200 μ m diameter spots with a 500 μ m pitch (distance b/w spots). These cells will be supplemented with factors involved in embryonic definitive hematopoiesis to enhance blood induction compared to our co-culture experiments. All in all, these studies demonstrate the use of tools that allow us to recapitulate aspects of the embryonic microenvironment to guide PSCs towards hematopoietic cells in an efficient and scalable fashion.



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».